

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Tese

**Efeitos da suplementação com *Lithothamnium calcareum* na
nutrição de vacas leiteiras: Impactos na produção, resposta
inflamatória e emissão de metano**

Magna Fabrícia Brasil Savela

Pelotas, 2025

Magna Fabrícia Brasil Savela

**Efeitos da suplementação com *Lithothamnium calcareum* na
nutrição de vacas leiteiras: Impactos na produção, resposta
inflamatória e emissão de metano**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de
Doutor em Ciências.

Orientador(a): Marcio Nunes Corrêa

Coorientadores:

Francisco Augusto Burkert Del Pino

Viviane Rohrig Rabassa

Pelotas, 2025

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação da Publicação

S263e Savela, Magna Fabrícia Brasil

Efeitos da suplementação com *Lithothamnium calcareum* na nutrição de vacas leiteiras [recurso eletrônico] : impactos na produção, resposta inflamatória e emissão de metano / Magna Fabrícia Brasil Savela ; Marcio Nunes Corrêa, orientador ; Francisco Augusto Burkert Del Pino, Viviane Rohrig Rabassa, coorientadores. — Pelotas, 2025.
107 f.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2025.

1. Tamponante ruminal. 2. Acidose ruminal subaguda. 3. Inflamação. 4. Metano entérico. I. Corrêa, Marcio Nunes, orient. II. Del Pino, Francisco Augusto Burkert, coorient. III. Rabassa, Viviane Rohrig, coorient. IV. Título.

CDD 636.20852

Magna Fabrícia Brasil Savela

Efeitos da suplementação com *Lithothamnium calcareum* na nutrição de vacas leiteiras: Impactos na produção, resposta inflamatória e emissão de metano

Tese aprovada, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 26 de junho de 2025

Banca examinadora:

Prof. Dr. Marcio Nunes Corrêa (Orientador)

Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof^a. Dra. Lisandre de Oliveira.

Doutora em Zootecnia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a. Dra. Paula Montagner

Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Dr. Uriel Secco Londero

Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Ao meu filho, minha maior motivação e alegria, com todo o meu amor.

Dedico.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, cuja presença e bênçãos me sustentaram ao longo desta caminhada.

Aos meus pais, Nedi Brasil Savela e Jorge Savela, meu eterno reconhecimento por todo o esforço, amor e incentivo incondicional que sempre me ofereceram. Foram pilares fundamentais nesta trajetória.

Ao meu esposo, Renan da Silva Lopes, meu parceiro de vida. Sou profundamente grata por seu amor constante, pela paciência nos momentos difíceis e por caminhar comigo com tanta leveza e carinho, sendo sempre meu porto seguro.

Ao meu filho, Heitor Savela Lopes, a mais pura fonte de amor e motivação. Obrigada por iluminar meus dias e por me mostrar, diariamente, o real sentido da vida.

Ao professor Marcio Nunes Corrêa, meu orientador, agradeço pela confiança, pela oportunidade de integrar o Núcleo de Pesquisa, Ensino, Extensão e Inovação em Pecuária (NUPEEC HUB) e pelo suporte contínuo durante essa jornada. Estendo minha gratidão aos meus Coorientadores e a toda a equipe do NUPEEC, pela partilha de conhecimentos e apoio constante.

Aos amigos, próximos ou distantes, que contribuíram com palavras de incentivo, risos e companhia nos momentos certos, meu muito obrigada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, por abrir as portas para minha formação doutoral e possibilitar esse importante passo acadêmico.

Agradeço também à Universidade Federal de Pelotas, instituição que me acolheu desde a graduação e desempenhou papel essencial no meu desenvolvimento profissional e pessoal. E à CAPES, meu reconhecimento pela concessão da bolsa de estudos que tornou esta caminhada possível.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Resumo

SAVELA, Magna Fabrícia Brasil. **Efeitos da suplementação com *Lithothamnium calcareum* na nutrição de vacas leiteiras: Impactos na produção, resposta inflamatória e emissão de metano.** 2025. 104 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2025.

Dietas com alta inclusão de amido são amplamente utilizadas na bovinocultura leiteira intensiva com o objetivo de aumentar a densidade energética da ração e, consequentemente, a produção de leite. No entanto, esse tipo de dieta eleva o risco de ocorrência da acidose ruminal subaguda (SARA), uma disfunção fermentativa que compromete a saúde do rúmen, o desempenho produtivo e pode desencadear processos inflamatórios sistêmicos. Para prevenir esse distúrbio, estratégias nutricionais devem ser adotadas, como a inclusão de fontes de fibra fisicamente efetiva e o uso de aditivos com ação tamponante. Neste contexto, o presente estudo avaliou os efeitos da suplementação com *Lithothamnium calcareum*, uma alga marinha com propriedades tamponantes e rica em minerais, sobre o pH ruminal, desempenho produtivo, parâmetros inflamatórios e emissão estimada de metano entérico em vacas leiteiras alimentadas com dieta rica em amido. O experimento foi conduzido com 36 vacas Holandesas múltiparas, distribuídas aleatoriamente em dois grupos (n = 18): grupo controle (CON), suplementado com bicarbonato de sódio (1,1% da MS), e grupo *Lithothamnium calcareum* (LITHO), suplementado com *Lithothamnium calcareum* (0,5% da MS). O período experimental teve duração de 60 dias, sendo que ambos os grupos receberam a mesma dieta basal (TMR com 29,28% de amido). O primeiro estudo teve como objetivo avaliar o impacto da suplementação com *Lithothamnium calcareum* sobre a saúde ruminal, comportamento alimentar e de atividade, produção e composição do leite, além do estado metabólico das vacas. O segundo estudo investigou os efeitos da suplementação com *Lithothamnium calcareum* sobre o pH ruminal e os níveis séricos de ferro e hepcidina, com o intuito de avaliar seu potencial como marcadores de inflamação sistêmica. Já o terceiro estudo estimou a produção de metano entérico a partir das proporções de ácidos graxos voláteis (AGV) no fluido ruminal e analisou sua relação com o consumo de matéria seca (CMS) em vacas suplementadas com *Lithothamnium calcareum*. De modo geral, os resultados indicam que o *Lithothamnium calcareum* é uma alternativa viável como aditivo tamponante em dietas altamente fermentativas, promovendo estabilidade ruminal e desempenho produtivo satisfatório, sem efeitos adversos sobre biomarcadores inflamatórios, metabolismo ou comportamento. No entanto, seus efeitos sobre a mitigação da emissão de metano entérico ainda requerem investigação mais aprofundada.

Palavras-chave: tamponante ruminal; inflamação; metano entérico; ácidos graxos voláteis.

Abstract

SAVELA, Magna Fabrícia Brasil. **Effects of *Lithothamnium calcareum* supplementation on dairy cow nutrition: Impacts on production, inflammatory response, and methane emissions.** 2025. 104 f. Thesis (PhD degree in Biotechnology) - Postgraduate Program in Biotechnology, Center for Technological Development, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2025.

High-starch diets are widely used in intensive dairy farming to increase the energy density of the feed and, consequently, milk production. However, such diets raise the risk of subacute ruminal acidosis (SARA), a fermentative disorder that impairs rumen health and productive performance, and may trigger systemic inflammatory processes. To prevent this condition, nutritional strategies should be adopted, such as the inclusion of physically effective fiber sources and the use of buffering additives. In this context, the present study evaluated the effects of supplementation with *Lithothamnium calcareum*, a marine algae with buffering properties and rich in minerals, on ruminal pH, productive performance, inflammatory parameters, and estimated enteric methane emissions in dairy cows fed a high-starch diet. The experiment was conducted with 36 multiparous Holstein cows, randomly assigned to two groups (n = 18): control group (CON), supplemented with sodium bicarbonate (1.1% of DM), and the *Lithothamnium calcareum* group (LITHO), supplemented with *Lithothamnium calcareum* (0.5% of DM). The experimental period lasted 60 days, and both groups received the same basal diet (TMR with 29.28% starch). The first study aimed to evaluate the impact of *Lithothamnium calcareum* supplementation on rumen health, feeding and activity behavior, milk yield and composition, as well as the cows' metabolic status. The second study investigated the effects of *Lithothamnium calcareum* supplementation on ruminal pH and serum levels of iron and hepcidin, aiming to assess their potential as biomarkers of systemic inflammation. The third study estimated enteric methane production based on the proportions of volatile fatty acids (VFA) in rumen fluid and analyzed its relationship with dry matter intake (DMI) in cows supplemented with *Lithothamnium calcareum*. Overall, the results indicate that *Lithothamnium calcareum* is a viable alternative as a buffering additive in highly fermentable diets, promoting ruminal stability and satisfactory productive performance, with no adverse effects on inflammatory biomarkers, metabolism, or behavior. However, its effects on enteric methane mitigation still require further investigation.

Keywords: ruminal buffer; inflammation; enteric methane; volatile fatty acids.

Lista de Figuras

Figura 1: Efeitos da suplementação com Lithothamnium calcareum (LITHO) e bicarbonato de sódio (CON) sobre os níveis séricos de ferro ao longo das coletas. 81

Figura 2: Efeitos da suplementação com Lithothamnium calcareum (LITHO) e bicarbonato de sódio (CON) sobre os níveis séricos de hepcidina ao longo das coletas.

..... 82

Lista de Tabelas

Manuscrito 1

Table 1. Intake, eating time, eating rate, milk yield and composition of Holstein cows fed diets supplemented with sodium bicarbonate (CON) or Lithothamnium calcareum (LITHO)	47
--	----

Table 2. Faecal pH and starch concentrations of Holstein cows fed diets supplemented with sodium bicarbonate (CON) or Lithothamnium calcareum (LITHO)	48
---	----

Table 3. Ruminal pH and molar proportions (mol/100 mol) of individual volatile fatty acids 4 h after the morning feeding from Holstein cows fed diets supplemented with sodium bicarbonate (CON) or Lithothamnium calcareum (LITHO)	49
---	----

Material suplementar

Tabela 1. Supplementary Table S1. Ingredients and chemical composition of basal TMR and concentrate of the experimental diets.....	51
--	----

Table 2. Supplementary Table S2. Feeding behavior and activity of Holstein cows fed diets supplemented with sodium bicarbonate (CON) or Lithothamnium calcareum (LITHO).....	52
--	----

Table 3. Supplementary Table S3. Blood metabolite and mineral concentrations of Holstein cows diets supplemented with sodium bicarbonate (CON) or Lithothamnium calcareum (LITHO).....	52
--	----

Tabela 4. Supplementary Table S4. Blood acid base balance of Holstein cows fed diets supplemented with sodium bicarbonate (CON) or Lithothamnium calcareum (LITHO).....	52
---	----

Manuscrito 2

Tabela 1. CMS, pH ruminal e AGV individual (acético, propiônico, butírico; mol/100 mol de AGV) de vacas holandesas alimentadas com dietas suplementadas com bicarbonato de sódio (CON) ou <i>Lithothamnium calcareum</i> (LITHO).....	56
---	----

Tabela 2. Rendimento de CH ₄ (RM) de vacas holandesas alimentadas com dietas suplementadas com bicarbonato de sódio (CON) ou <i>Lithothamnium calcareum</i>	
--	--

(LITHO).....	57
--------------	----

Tabela 3. Correlação entre o CMS semanal e o rendimento de CH ₄ (RM) de vacas holandesas alimentadas com dietas suplementadas com bicarbonato de sódio (CON) ou <i>Lithothamnium calcareum</i> (LITHO).....	57
--	----

Tabela 4. Correlação entre as proporções de acetato, propionato e butirato com o CMS semanal (s) de vacas holandesas alimentadas com dietas suplementadas com bicarbonato de sódio (CON) ou <i>Lithothamnium calcareum</i> (LITHO).....	57
---	----

Manuscrito 3

Tabela 1. Ingredientes da ração total misturada (TMR), do concentrado e composição química da TMR basal das dietas experimentais.....	77
---	----

Tabela 2. pH ruminal e concentrações de Ferro e hepcidina sérica de vacas Holandesas alimentadas com dieta contendo 29,28% de amido, suplementadas com <i>Lithothamnium calcareum</i> (LITHO) ou bicarbonato de sódio (CON).....	78
--	----

Tabela 3. Correlação de ferro e hepcidina com parâmetros metabólitos em vacas leiteiras em lactação suplementadas com <i>Lithothamnium calcareum</i>	79
--	----

Tabela 4. Correlação de ferro e hepcidina com parâmetros metabólitos em vacas leiteiras em lactação suplementadas com bicarbonato de sódio.....	80
---	----

Lista de Abreviaturas e Siglas

AGNE	Ácidos graxos não esterificados
AGV	Ácidos graxos voláteis
APPs	Proteínas de fase aguda
ARC	Acidose ruminal clínica
BAM	Bramley Acidosis Model
BHB	β -hidroxibutirato
Ca^{2+}	Íons cálcio
CaCO_3	Carbonato de cálcio
CH_4	Metano
CMS	Consumo de matéria seca
CNF	Carboidratos não fibrosos
CO_2	Dióxido de carbono
CRP	Proteína C-reativa
DEL	Dias em lactação
ECM	Produção de leite corrigida para energia
FADH_2	Dinucleótido de flavina adenina reduzido
FCM	Produção de leite corrigida para 4% de gordura
GEE	Gases de efeito estufa
H_2	Hidrogênio
H_2CO_3	Ácido carbônico
Hp	Haptoglobina
IL-1 β	Interleucina-1 beta
IL-6	Interleucina-6
LBP	Proteína ligadora de LPS
LGI	Low-grade inflammation
LPS	Lipopolissacarídeos
MCR	Enzima metil-coenzima M redutase
$\text{Mg}(\text{OH})_2$	Hidróxido de magnésio
MgO	Óxido de magnésio
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzido
NaHCO_3	Bicarbonato de sódio
NF- κ B	Fator nuclear kappa B
NO_3^-	Nitrato
peNDF	Fibra fisicamente eficaz
PMR	Ração mista parcial
RDS	Amido degradável no rúmen
SAA	Amiloide A sérico
SARA	Acidose ruminal subaguda
SO_4^{2-}	Sulfato
TLR-4	Receptor Toll-like 4
TMR	Dieta total misturada
TNF- α	Fator de necrose tumoral

Sumário

1 Introdução geral	14
2 Hipóteses e Objetivos	15
2.1 Hipóteses	15
2.2 Objetivo geral	15
2.3 Objetivos específicos	15
3 Revisão Bibliográfica	17
1 Introdução	17
2 Acidose Ruminal	18
2.1 Etiologia, Prevalência e Incidência	18
2.2 Fisiopatologia e Fermentação Ruminal	22
2.3 Diagnóstico e Indicadores Clínicos	26
2.4 Consequências Produtivas	29
2.5 Estratégias de Prevenção e Controle da Acidose Ruminal	30
3 Produção de Metano em Ruminantes	34
3.1 Metanogênese Ruminal: Arqueias e Destino do Hidrogênio	34
3.2 Impactos da Emissão de Metano (CH ₄)	36
3.3 Estratégias de Mitigação	37
4 <i>Lithothamnium calcareum</i> : Uma Estratégia Dupla	39
4.1 Composição Química e Ação como Tampão	39
4.2 Efeitos sobre o Rúmen e a Microbiota	40
4.3 Potencial na Mitigação de Metano	41
4 Desenvolvimento	44
4.1 Manuscrito 1	44
4.2 Manuscrito 2	53
4.3 Manuscrito 3	60
5 Considerações Finais	83
Referências	85
Anexos	85

1 Introdução geral

A manutenção da saúde ruminal é essencial para assegurar a produtividade, o bem-estar animal e a sustentabilidade ambiental na bovinocultura leiteira moderna (Huot *et al.*, 2023). Em sistemas intensivos de produção, dietas com alta inclusão de alimentos concentrados são frequentemente utilizadas para atender às exigências energéticas elevadas e otimizar o desempenho produtivo (Golder & Lean, 2024). Contudo, a substituição de forragens por grãos ricos em amido compromete o aporte de fibra fisicamente eficaz (peNDF) ao rúmen, elemento fundamental para estimular a ruminação, a salivação — principal fonte de tampões fisiológicos — e o equilíbrio fermentativo ruminal (Allen, 1997; Zebeli *et al.*, 2012; Humer *et al.*, 2018).

A rápida fermentação dos concentrados promove a intensa produção de ácidos graxos voláteis (AGV), especialmente propionato, acetato e butirato (Aschenbach *et al.*, 2010). Quando a taxa de produção de AGV excede a capacidade de tamponamento intraruminal, o pH ruminal declina, predispondo o animal à acidose ruminal subaguda (subacute ruminal acidosis - SARA), quadro caracterizado por pH persistentemente reduzido e prejuízos à digestibilidade, integridade epitelial e eficiência produtiva (Dirksen, 1985). Além disso, a SARA está associada a processos inflamatórios sistêmicos, que podem ser monitorados por meio de biomarcadores sensíveis, como o ferro e a hepcidina (Ganz & Nemeth, 2012; Wysocka *et al.*, 2020).

Entre as estratégias de mitigação da SARA, destaca-se o uso de tamponantes dietéticos, sendo o bicarbonato de sódio o mais comum (Neville *et al.*, 2022). Entretanto, sua solubilidade elevada e ação de curta duração têm motivado o interesse por alternativas mais eficientes (Cruywagem *et al.*, 2015). Nesse cenário, o *Lithothamnium calcareum*, uma alga marinha calcificada rica em carbonatos de cálcio e magnésio, surge como uma alternativa promissora devido à liberação gradual desses minerais em ambiente ácido e ao seu efeito tamponante prolongado (Cruywagem *et al.*, 2015).

Além de promover a estabilidade ruminal, estudos indicam que o *Lithothamnium calcareum* pode melhorar parâmetros produtivos e metabólicos, influenciar positivamente o comportamento alimentar (Cruywagem *et al.*, 2015; Neville

et al., 2019) e contribuir para a redução da produção de gases de efeito estufa, como o metano (CH₄) entérico (Simanungkalit *et al.*, 2023; Guerreiro *et al.*, 2025).

Assim, além de preservar a homeostase ruminal, a suplementação com *Lithothamnium calcareum* pode representar uma ferramenta nutricional com potencial mitigador da metanogênese. Essa possibilidade, associada ao monitoramento de parâmetros fisiológicos e ambientais, contribui para o avanço de sistemas leiteiros mais eficientes e ambientalmente responsáveis (Guerreiro *et al.*, 2025).

2 Hipóteses e Objetivos

2.1 Hipóteses

A suplementação dietética de vacas leiteiras com *Lithothamnium calcareum* é mais eficaz do que o bicarbonato de sódio convencional na manutenção da homeostase ruminal, na melhora da eficiência produtiva, na atenuação de processos inflamatórios sistêmicos induzidos por dietas ricas em amido, e na redução da emissão de CH₄.

2.2 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da suplementação com *Lithothamnium calcareum*, em comparação ao bicarbonato de sódio, sobre a saúde ruminal, a produção de leite, os parâmetros inflamatórios e a produção estimada de metano entérico em vacas leiteiras alimentadas com dieta rica em amido.

2.3 Objetivos específicos

Comparar os efeitos de *Lithothamnium calcareum* e bicarbonato de sódio sobre o pH ruminal e os parâmetros de fermentação (AGV e pH fecal) em vacas leiteiras.

Avaliar o consumo de matéria seca (CMS), o comportamento alimentar, o comportamento animal e a eficiência alimentar de vacas leiteiras suplementadas com *Lithothamnium calcareum* ou bicarbonato de sódio.

Determinar os efeitos da suplementação com *Lithothamnium calcareum* ou bicarbonato de sódio sobre a produção e composição do leite (gordura, proteína, lactose e sólidos totais).

Analisar o perfil metabólico sanguíneo e os biomarcadores (ferro e hepcidina) em vacas suplementadas com *Lithothamnium calcareum* ou bicarbonato de sódio.

Investigar as correlações entre os níveis de ferro/hepcidina e outros indicadores metabólicos (proteínas totais, albumina, ureia, glicose, magnésio, cálcio, ácidos graxos não esterificados (AGNE), e β -hidroxibutirato (BHB)).

Estimar a produção de metano entérico com base no perfil de AGV e avaliar o potencial do *Lithothamnium calcareum* como agente mitigador da metanogênese.

3 Revisão Bibliográfica

Acidose ruminal subaguda e emissão de metano em ruminantes: fisiopatologia, impactos produtivos e estratégias de controle com ênfase no uso de *Lithothamnium calcareum*

1 Introdução

A intensificação dos sistemas de produção animal, especialmente na bovinocultura leiteira e de corte, tem promovido desafios significativos à saúde digestiva e à sustentabilidade ambiental dos rebanhos (Voulgarakis *et al.*, 2023). Entre os principais distúrbios metabólicos associados a dietas de alta densidade energética, destaca-se a acidose ruminal subaguda (SARA), condição pró-inflamatória de base fermentativa que compromete a digestibilidade da fibra, o desempenho zootécnico e a saúde sistêmica dos animais (Golder & Lean, 2024; Voulgarakis *et al.*, 2023). Paralelamente, a fermentação ruminal de carboidratos está intrinsecamente ligada à produção de metano (CH₄), entérico gás de efeito estufa com elevado potencial de aquecimento global, cuja emissão representa também perdas energéticas significativas para os ruminantes (McAllister & Newbold, 2008; Wanapat *et al.*, 2024).

Embora a SARA e a produção de CH₄ compartilhem origens no processo fermentativo ruminal, os fatores que as desencadeiam podem exercer efeitos divergentes. Dietas com alto teor de amido rapidamente fermentável elevam o risco de SARA ao promoverem a acidificação do rúmen, mas, paradoxalmente, tendem a reduzir a emissão de CH₄ por redirecionar o hidrogênio (H₂) para vias alternativas, como a síntese de propionato (Krause & Oetzel, 2006; Golder & Lean, 2024). Essa complexa interação entre saúde ruminal e emissão de gases de efeito estufa (GEE) ressalta a importância de estratégias nutricionais integradas, que aliem estabilidade fermentativa, bem-estar animal e sustentabilidade ambiental (Loučka *et al.*, 2024).

Nesse cenário, destaca-se a utilização de aditivos naturais como o *Lithothamnium calcareum*, uma alga calcária rica em carbonatos de cálcio e magnésio, cuja liberação gradual de minerais favorece o tamponamento ruminal, a modulação da microbiota e, potencialmente, a mitigação da metanogênese (Cruywagen *et al.*, 2015; Neville *et al.*, 2019; Loučka *et al.*, 2024).

A presente revisão tem como objetivo integrar o conhecimento atual sobre a SARA e a produção de CH₄, abordando seus mecanismos fisiopatológicos, impactos produtivos e ambientais, bem como avaliar criticamente as estratégias de prevenção e controle, com ênfase especial no *Lithothamnium calcareum* como aditivo nutricional de ação dual: tamponante e redutor da metanogênese.

2 Acidose Ruminal

2.1 Etiologia, Prevalência e Incidência

A acidose ruminal é uma desordem metabólica complexa, caracterizada pela redução do pH do conteúdo ruminal em decorrência da fermentação excessiva de carboidratos altamente fermentescíveis, resultando na produção elevada de ácidos orgânicos, como ácidos graxos voláteis (AGV) e ácido lático (Golder & Lean, 2024). Valores persistentemente inferiores a 5,8 comprometem a atividade microbiana celulolítica, prejudicam a digestão da fibra e, em casos mais graves, podem desencadear inflamações sistêmicas e reduções significativas na produtividade (Voulgarakis *et al.*, 2023). Trata-se de uma das principais enfermidades nutricionais em sistemas intensivos de produção animal, especialmente na bovinocultura de leite e de corte (Huot *et al.*, 2023).

A acidose ruminal pode ser entendida como um contínuo de distúrbios fermentativos que se distinguem principalmente pela gravidade, duração, concentração de ácidos orgânicos no rúmen e manifestação clínica (Golder & Lean, 2024). A forma mais grave, conhecida como acidose ruminal clínica (ARC), ou acidose aguda/lática, apresenta início súbito, curta duração e sinais clínicos evidentes, sendo geralmente causada pelo acesso abrupto a grandes quantidades de carboidratos de rápida fermentação, como grãos ou açúcares simples (Golder *et al.*, 2012, 2014; Voulgarakis *et al.*, 2023). Os sinais clínicos incluem diarreia com presença de grãos e odor adocicado, dor abdominal, taquicardia, taquipneia, ataxia, decúbito, redução acentuada da produção leiteira e, em casos extremos, morte em poucas horas (Golder *et al.*, 2012).

Em contraste, quadros mais brandos e de progressão gradual configuram a acidose ruminal subaguda (do inglês Subacute Ruminant Acidosis – SARA), também conhecida como acidose subclínica (ARS) (Golder & Lean, 2024). Essa condição

caracteriza-se por quedas moderadas, porém recorrentes, do pH ruminal ao longo do dia (Mensching *et al.*, 2021; Hou *et al.*, 2025). Ainda não há consenso sobre o ponto de corte para diagnóstico, o que reflete a variabilidade individual na tolerância à acidose (Humer *et al.*, 2015; Huot *et al.*, 2023).

Garrett *et al.* (1999) sugerem $\text{pH} \leq 5,5$ em amostras por rumenocentese, enquanto Plaizier (2004) propõe $\text{pH} \leq 6,0$ em coletas por sonda estomacal, cerca de quatro horas após a alimentação. Devido às flutuações diurnas, o momento da amostragem é decisivo para a precisão diagnóstica (DeVries *et al.*, 2008; Jonsson *et al.*, 2019).

Critérios temporais também passaram a ser considerados: pH abaixo de 5,6 por mais de 3 horas/dia (Plaizier *et al.*, 2008), ou abaixo de 5,8 por mais de 5 a 6 horas (Zebeli *et al.*, 2008). Gozho *et al.* (2005) consideram a permanência entre pH 5,2 e 5,8 por 3 horas como indicativo de SARA. Outros autores apontam que $\text{pH} < 5,5$ por ao menos uma hora já configura risco significativo (Cruywagen *et al.*, 2015; Neville *et al.*, 2019; Jaramillo-López *et al.*, 2017). Embora o pH não atinja níveis críticos como na acidose aguda, sua queda sustentada compromete a função ruminal e a saúde animal (Voulgarakis *et al.*, 2023).

No entanto, o pH isolado é um marcador limitado frente à complexidade fisiopatológica da SARA. Plaizier *et al.* (2022) e Golder & Lean (2024) propuseram o Bramley Acidosis Model (BAM) como abordagem diagnóstica multivariada. Esse modelo inclui, além do pH, a elevação de propionato (>30 mM) e valerato ($>2,4$ mM), amônia reduzida (<3 mM) e baixa concentração de ácido lático, indicando fermentação acidogênica alterada.

O BAM também incorpora sinais produtivos e comportamentais: variações no consumo de matéria seca (CMS), queda do teor de gordura do leite, redução da condição corporal, laminite, menor eficiência alimentar e aumento nas taxas de descarte e mortalidade (Morgante *et al.*, 2007; Denwood *et al.*, 2018; Golder *et al.*, 2023).

Adicionalmente, há evidências crescentes de disbiose ruminal em SARA, com aumento de compostos tóxicos como lipopolissacarídeos (LPS) e histamina

(Emmanuel *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2017). O LPS, ao atravessar o epitélio ruminal em condições de disbiose e aumento da permeabilidade, ativa receptores imunes como o Toll-like receptor 4 (TLR-4), presentes em células hepáticas e no sistema imune inato. Essa ativação desencadeia uma cascata inflamatória sistêmica, com aumento na produção de interleucinas pró-inflamatórias (como IL-1 β , IL-6 e TNF- α) e de proteínas de fase aguda, como a haptoglobina. Além do LPS, a histamina, produzida pela descarboxilação de histidina por bactérias ruminais, desempenha papel importante na inflamação, promovendo vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e recrutamento de células inflamatórias, o que agrava a integridade epitelial e dificulta sua regeneração (Aschenbach & Gabel, 2000; Golder *et al.*, 2014).

Assim, a SARA deve ser compreendida como uma síndrome inflamatória de base nutricional, com manifestações subclínicas, mas de expressivo impacto zootécnico e sanitário (Golder & Lean, 2024). Seu diagnóstico e manejo exigem abordagem integrativa baseada em dados fermentativos, bioquímicos, inflamatórios e produtivos (Huot *et al.*, 2023), fundamental para o desenvolvimento de estratégias preventivas em sistemas intensivos (Elmhadi *et al.*, 2022).

Entre a normalidade e a SARA plenamente estabelecida, há estados transitórios caracterizados por flutuações pontuais no pH ruminal. Embora sem sinais clínicos claros, essas alterações recorrentes podem predispor ao desenvolvimento de quadros persistentes (Golder & Lean, 2024). Embora mal definidos, esses estados intermediários têm importância reconhecida pelo potencial impacto cumulativo sobre saúde e desempenho (Studdert *et al.*, 2020).

Estudos epidemiológicos recentes demonstram que a prevalência da SARA em vacas leiteiras varia entre 19% e 26% em rebanhos de alta produção na América do Norte e Europa (Plaizier *et al.*, 2018). Um extenso estudo conduzido na Austrália identificou que aproximadamente 10% das vacas leiteiras com menos de 100 dias em lactação (DEL) apresentavam acidose ruminal, conforme avaliação integrada de AGV, amônia, ácido láctico e pH ruminal (Bramley *et al.*, 2008). Corroborando com esses achados, um estudo multinacional realizado por Golder *et al.*, (2023), utilizando a mesma abordagem diagnóstica, encontrou uma prevalência geral de 26,1% em vacas leiteiras <100 DEL, quando amostradas entre 2 e 3 horas após a alimentação. No

Brasil, dados recentes indicam prevalências de SARA em torno de 20% em rebanhos leiteiros intensivos, sendo a condição frequentemente subdiagnosticada, o que pode mascarar seu impacto real sobre o desempenho produtivo e a saúde dos animais (Rezende *et al.*, 2022).

Com base na estimativa de Golder *et al.*, (2014) de que cada episódio de SARA tem duração média de dois dias, e considerando uma prevalência de 10% reportada por Bramley *et al.*, (2008), Golder & Lean (2024) projetaram uma incidência de aproximadamente 500 episódios de SARA nos primeiros 100 dias de lactação para cada 100 vacas. Esses dados indicam que muitas vacas podem apresentar múltiplos episódios ao longo da lactação, especialmente em rebanhos de alta produção, nos quais o desafio metabólico e a pressão alimentar são mais intensos.

As fases de transição e lactação intermediária representam os principais períodos de risco para o desenvolvimento da SARA. No período de transição, fatores como estresse do parto, início da lactação, mudanças de ambiente e dietas com alta carga de carboidratos fermentáveis contribuem para a redução do CMS e para uma adaptação insuficiente do epitélio ruminal. A adaptação das papilas ruminais à maior produção de AGV exige tempo e estímulo progressivo. Em estudo clássico, Dirksen (1985) demonstrou que a substituição gradual de dietas fibrosas por dietas com maior densidade energética, nas semanas que antecedem o parto, promove crescimento papilar significativo.

Entretanto, resultados contrastantes apresentados por Andersen *et al.*, (1999) sugerem que níveis inadequados de concentrado durante o período pré-parto podem não induzir alterações morfológicas expressivas nas papilas, prejudicando a absorção de AGV e elevando o risco de acidose. Além disso, o modo de fornecimento da dieta também interfere no risco de SARA. Quando os ingredientes são oferecidos separadamente (alimentação por componentes), há menor estímulo à mastigação e menor produção salivar, o que compromete o tamponamento ruminal (Maekawa *et al.*, 2002).

Na lactação intermediária, a ocorrência de SARA está frequentemente ligada a falhas no manejo alimentar. Erros na formulação e entrega da dieta total (TMR), como supermistura da ração ou desequilíbrio entre as frações de volumoso e concentrado,

podem levar a uma ingestão excessiva de carboidratos fermentáveis e à redução da fibra fisicamente efetiva. Fatores adicionais, como frequência inadequada de alimentação, intervalo entre o fornecimento de concentrado e volumoso, e competição por alimento em rebanhos de alta densidade — onde vacas dominantes tendem a consumir maiores quantidades de concentrado — também contribuem para o risco (Nordlund *et al.*, 1995).

Em rebanhos de alta produção, o aumento do CMS e da taxa de passagem ruminal intensifica ainda mais o desafio de manter a estabilidade do pH ruminal (Firkins *et al.*, 2001). Embora muitas vezes transitória e subclínica, a SARA pode evoluir para quadros clínicos de acidose, sobretudo quando há queda acentuada na ingestão. Nessas situações, o manejo nutricional assume papel decisivo, e falhas humanas no preparo e fornecimento das dietas devem ser reconhecidas como fatores de risco relevantes, mesmo em sistemas bem tecnificados (Golder *et al.*, 2023).

2.2 Fisiopatologia e Fermentação Ruminal

Em condições fisiológicas normais, a digestão dos alimentos em ruminantes ocorre predominantemente no rúmen, um compartimento anaeróbico que abriga uma complexa comunidade microbiana (Golder & Lean, 2024). Nesse ambiente, predominam bactérias fermentadoras que degradam os carboidratos e proteínas da dieta, produzindo como principais subprodutos os AGV, principalmente acético, propiônico e butírico, além de menores quantidades de isobutírico, valérico, isovalérico e 2-metilbutírico (Van Soest, 1994; Golder & Lean, 2024). Também são sintetizados compostos como proteína microbiana e vitaminas do complexo B e K (Kozloski, 2002).

A natureza da dieta influencia diretamente o perfil fermentativo: forragens favorecem a produção de ácido acético, enquanto dietas ricas em amido estimulam a formação de ácido propiônico (Kozloski, 2002). Esses AGV representam até 85% da energia metabolizável absorvida pelos ruminantes (Van Soest, 1994), sendo absorvidos ativamente pelo epitélio ruminal. O pH ruminal ideal situa-se entre 6,0 e 7,0, intervalo que mantém a atividade eficiente das bactérias celulolíticas. No entanto, o consumo excessivo de carboidratos não fibrosos (CNF) compromete esse equilíbrio,

ao favorecer a proliferação de bactérias amilolíticas e lactato-produtoras (Owens *et al.*, 1998).

A acidose ruminal é uma desordem metabólica multifatorial desencadeada pelo acúmulo de ácidos no rúmen, resultado de uma fermentação acelerada de dietas ricas em amido e açúcares solúveis, cuja absorção e tamponamento tornam-se insuficientes (Vieira-Neto *et al.*, 2021). A fermentação intensa de CNF promove a produção excessiva de AGV e, sobretudo, de ácido láctico – este último com pKa inferior (3,80), o que intensifica a acidificação em comparação aos AGV, cujo pKa varia entre 4,76 e 4,82 (Dijkstra *et al.*, 2012). Esse acúmulo de ácidos ultrapassa a capacidade de neutralização salivar (baseada em bicarbonato e fosfato) e de absorção epitelial, resultando em queda abrupta do pH ruminal (Mackie & Gilchrist, 1979; Aschenbach *et al.*, 2011). Além disso, a ingestão rápida e em grande volume de alimentos concentrados reduz o tempo de mastigação e ruminação, o que compromete a salivação e agrava a acidificação (Vieira-Neto *et al.*, 2021).

A forma aguda da acidose (ARA) é causada por ingestão súbita e volumosa de grãos altamente fermentescíveis, como milho ou trigo, os quais estimulam a rápida proliferação de *Streptococcus bovis* e *Lactobacillus spp.*, bactérias produtoras de grandes quantidades de ácido láctico (Owens *et al.*, 1998; Haji-Hajikolaei *et al.*, 2006; Lettat *et al.*, 2010). A SARA é caracterizada por quedas moderadas, mas prolongadas do pH ruminal, com valores frequentemente abaixo de 5,8 por várias horas do dia (Hou *et al.*, 2025). Esse distúrbio está associado à ingestão de dietas acidogênicas com baixa efetividade física da fibra e alta proporção de concentrados (Mawda *et al.*, 2022). A ingestão insuficiente de fibra fisicamente eficaz compromete a mastigação e a secreção salivar, prejudica a formação do tapete ruminal, reduz a retenção de partículas e acelera a taxa de passagem, fatores que juntos limitam a digestão da fibra e favorecem a queda do pH (Golder *et al.*, 2023). Além disso, a SARA é frequente em situações de transição alimentar abrupta, como a passagem rápida de dietas volumosas para dietas concentradas, em sistemas com fornecimento excessivo de grãos ou em esquemas de ração mista parcial (PMR) com fornecimento separado de concentrado (Owens *et al.*, 1998; Millen *et al.*, 2016; Monteiro & Faciola, 2020).

Microbiologicamente, a acidose promove uma disbiose significativa: ocorre substituição de bactérias Gram-negativas especializadas na degradação de fibra,

como *Fibrobacter succinogenes* e *Ruminococcus flavefaciens*, por Gram-positivas acidotolerantes, como *Lactobacillus spp.* e *Prevotella* (Petri *et al.*, 2013; Mickdam *et al.*, 2016; Hua *et al.*, 2017). Há ainda aumento de patógenos como *Clostridium perfringens* e *Escherichia coli* (Khafipour *et al.*, 2016). A população de protozoários ciliados – especialmente *Polyplastron* e *Ostracodinium*, que modulam a fermentação amilolítica – também é reduzida em dietas com alto concentrado, favorecendo o domínio de espécies mais acidotolerantes como *Entodinium* (Castillo-González *et al.*, 2014). Quanto às arqueias metanogênicas, embora as alterações sejam menos consistentes, estudos relatam redução em sua diversidade sob dietas ricas em amido (Mao *et al.*, 2016).

A exposição prolongada a dietas ricas em grãos desencadeia alterações imunológicas importantes em bovinos, frequentemente culminando em um quadro de inflamação sistêmica (Golder & Lean, 2024). Um dos principais fatores envolvidos nesse processo é a liberação de LPS, componentes da parede externa de bactérias Gram-negativas que se acumulam no rúmen em decorrência da lise bacteriana provocada pela acidificação ruminal ou pela rápida proliferação microbiana (Fu *et al.*, 2022). Quando a integridade da barreira epitelial é comprometida, o LPS pode translocar-se para a circulação sanguínea, ativando receptores do tipo Toll (TLR4) e desencadeando a síntese de citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), a interleucina-1 beta (IL-1 β) e a interleucina-6 (IL-6) (Hou *et al.*, 2025).

Paralelamente, há aumento na produção de proteínas de fase aguda, como amiloide A sérico (SAA), haptoglobina (Hp), proteína ligadora de LPS (LBP) e proteína C-reativa (CRP), marcadores clássicos da inflamação sistêmica (Gozho *et al.*, 2007; Fu *et al.*, 2022). A elevação desses biomarcadores, mesmo na ausência de manifestações clínicas evidentes, evidencia a ocorrência de inflamação subclínica, também chamada de inflamação de baixo grau (low-grade inflammation, LGI), que compromete o bem-estar, a eficiência imunológica e o desempenho produtivo dos animais (Hou *et al.*, 2025).

A maior permeabilidade epitelial ruminal também permite a absorção de compostos microbianos potencialmente tóxicos, como histamina, aminas biogênicas e D-lactato (Golder & Lean, 2024). Dentre esses, a histamina se destaca por seu papel

na indução de respostas inflamatórias locais e sistêmicas, estando associada à patogênese de enfermidades como mastite e laminite, por meio da ativação da via NF- κ B e do aumento da permeabilidade vascular (Zhao *et al.*, 2020). De maneira semelhante, o ácido γ -D-glutamil-meso-diaminopimérico (iE-DAP), um derivado de peptidoglicano bacteriano, também se acumula durante a SARA e ativa a via inflamatória NOD1-NF- κ B, contribuindo para danos hepáticos e mamários (Zhao *et al.*, 2020). Esse quadro inflamatório é agravado pela presença de D-lactato, capaz de provocar inflamações articulares e de favorecer o desenvolvimento de laminite (Zhang *et al.*, 2020).

As consequências da inflamação induzida pela SARA extrapolam o ambiente gastrointestinal (Zhao *et al.*, 2018). O LPS pode atingir tecidos distantes, como fígado, útero, glândula mamária e tecido laminar, sendo implicado na etiologia de hepatite, endometrite, mastite e laminite, respectivamente (Guo *et al.*, 2019; Fu *et al.*, 2022). A via porta hepática desempenha papel central na translocação dessas toxinas e microrganismos a partir do rúmen, especialmente quando há comprometimento da integridade da mucosa gastrointestinal (Fu *et al.*, 2022).

Além disso, a SARA favorece a translocação bacteriana, isto é, a passagem de bactérias viáveis do trato digestivo para a corrente sanguínea, possibilitando a colonização de órgãos normalmente estéreis, como útero e glândula mamária, e contribuindo para a ocorrência de infecções secundárias, como metrite e mastite (Fu *et al.*, 2022). Esse fenômeno está associado à disbiose microbiana e à perda da integridade das barreiras epiteliais.

A disbiose induzida pela SARA também compromete a função imunológica do hospedeiro, uma vez que microrganismos simbióticos desempenham papel essencial na maturação e modulação do sistema imune, especialmente via interação com o tecido linfóide associado ao intestino (GALT) (Hou *et al.*, 2025). A redução da diversidade microbiana impacta negativamente as respostas imune inata e adaptativa, aumentando a vulnerabilidade a infecções oportunistas (Goto & Kiyono, 2012; Brestoff & Artis, 2013).

Dessa forma, a SARA deve ser compreendida não apenas como uma afecção ruminal de base metabólica, mas como uma condição inflamatória sistêmica, com

múltiplas repercussões clínicas e subclínicas sobre a saúde e o desempenho dos ruminantes.

2.3 Diagnóstico e Indicadores Clínicos

O diagnóstico da acidose ruminal subaguda (SARA) representa um desafio clínico e prático, especialmente devido à limitação dos métodos disponíveis na rotina de campo. A mensuração direta do pH ruminal, embora amplamente empregada, apresenta restrições quanto à representatividade e à viabilidade operacional (Golder & Lean, 2024). Amostragens pontuais por sonda oro-ruminal ou por rumenocentese podem não captar as oscilações diurnas do pH características da SARA, e a quantificação dos ácidos graxos voláteis (AGV) demanda infraestrutura especializada, frequentemente indisponível nas propriedades leiteiras (Oetzel, 2017; Voulgarakis *et al.*, 2023).

Diante dessas limitações, o diagnóstico clínico da SARA deve ser fundamentado em uma abordagem multifatorial, que integre observações clínicas, histórico alimentar, exame físico e sinais comportamentais (Golder & Lean, 2024).

O fluido ruminal, obtido por sonda oro-ruminal, rumenocentese ou fístula, permanece uma ferramenta diagnóstica valiosa. Alterações em sua aparência, como coloração leitosa, presença de grãos e odor ácido, são sugestivas de disfunção fermentativa. Fluido aquoso, com bolhas e baixa viscosidade, também indica distúrbio na fermentação ruminal (Rosenberger *et al.*, 1979; Golder & Lean, 2024). A mensuração do pH é central para o diagnóstico da SARA: valores entre 5,5 e 5,8 são considerados indicativos da condição, especialmente quando mantidos por três ou mais horas diárias. Contudo, a acurácia diagnóstica depende do método de coleta, sendo a rumenocentese considerada o padrão-ouro (Bramley *et al.*, 2008; Golder *et al.*, 2023).

A análise dos AGV ruminais permite avaliar o padrão fermentativo. Em quadros de SARA, pode haver alterações na proporção entre acetato, propionato e butirato, com aumento relativo do propionato (Golder *et al.*, 2014). A concentração de amônia ruminal também pode fornecer informações importantes sobre a atividade microbiana e o balanço proteína/energia da dieta, sendo útil quando interpretada em conjunto com os AGV e o pH (Golder & Lean, 2024).

A dosagem de ácido láctico, especialmente de seus isômeros D e L, é uma ferramenta complementar na avaliação da SARA. No entanto, sua interpretação exige cautela devido à rápida flutuação das concentrações e à variabilidade individual entre os animais (Golder & Lean, 2024). Por isso, os níveis de ácido láctico devem ser analisados juntamente com os AGV, a amônia e os sinais clínicos. Na SARA, o aumento do ácido láctico é discreto, geralmente inferior a 1 mmol/l (Sun *et al.*, 2018), o que contrasta com os níveis observados na ARA (50–150 mmol/l) (Nagaraja & Titgemeyer, 2007; Henning *et al.*, 2010).

Outros biomarcadores, como histamina e LPS, vêm sendo estudados. No entanto, seu uso clínico ainda é limitado. A histamina é rapidamente metabolizada e nem sempre reflete a gravidade do quadro (Brent, 1976). Os LPS estão associados à resposta inflamatória sistêmica, mas a falta de padronização analítica limita sua aplicabilidade diagnóstica (Monteiro & Faciola, 2020).

A análise da microbiota ruminal surge como ferramenta promissora para o diagnóstico da SARA. Durante o distúrbio, ocorre substituição de bactérias gram-negativas por gram-positivas, como cocos e bacilos produtores de ácido láctico (Dirksen, 1970; Nagaraja & Titgemeyer, 2007). Abordagens multiômicas — como metagenômica, transcriptômica, metabolômica e proteômica — têm avançado o conhecimento sobre a disbiose associada à SARA (Golder *et al.*, 2023).

Animais acometidos pela SARA podem apresentar comportamento apático, redução da ruminação e da atividade geral, além de menor ingestão de alimento (Beauchemin, 2018). A estimativa do tempo de ruminação pode ser utilizada como um índice de saúde, pois vacas que ruminam menos tendem a apresentar maior risco para distúrbios digestivos (Hamilton *et al.*, 2019).

A avaliação do preenchimento ruminal também pode fornecer pistas diagnósticas, sendo frequentemente reduzido em vacas com queda no consumo. A diminuição do consumo de matéria seca (CMS) é um dos indicadores mais sensíveis da SARA, ocorrendo concomitantemente à queda do pH ruminal. Esse quadro frequentemente está associado à seleção de partículas da dieta, comportamento observado em vacas que rejeitam frações mais fibrosas (DeVries *et al.*, 2014). Essa seleção aumenta a variabilidade do pH ao longo do dia, perpetuando um ciclo de

recaída e recuperação (Golder *et al.*, 2023). Em sistemas nos quais o concentrado é fornecido durante a ordenha, os resíduos deixados por vacas afetadas podem ser consumidos por outros animais, ampliando o risco de SARA para o rebanho (Silberberg *et al.*, 2024). De forma semelhante, quando o concentrado é fornecido separadamente do volumoso, pode haver consumo excessivo deste componente, elevando o risco de distúrbios fermentativos (Silberberg *et al.*, 2024).

A análise da composição do leite, embora não específica, pode funcionar como um indicador indireto da SARA (Voulgarakis *et al.*, 2023). A relação gordura/proteína, que em vacas saudáveis varia entre 1,2 e 1,4, pode cair para valores inferiores a 1,0 em casos de acidose subaguda. Isso ocorre em função da alteração do perfil fermentativo ruminal, com menor produção de acetato e butirato — precursores da síntese de gordura — e aumento do propionato, que inibe a lipogênese na glândula mamária (Krause & Oetzel, 2006). Além disso, alterações nos perfis de ácidos graxos do leite, como aumento de C18:1 trans-10 ou redução de ácidos ramificados, oferecem maior sensibilidade diagnóstica, embora ainda tenham uso restrito na rotina (Gott *et al.*, 2015; Mensching *et al.*, 2021). Tecnologias como a espectroscopia automatizada no leite também têm sido desenvolvidas para ampliar as ferramentas de monitoramento (Golder & Lean, 2024).

Entre outras abordagens experimentais, a análise de fezes, urina, sangue e biomarcadores inflamatórios tem contribuído para o diagnóstico da SARA. Os valores de pH urinário tendem a ser mais alcalinos nessa condição, situando-se entre 7,8 e 8,3 (Li *et al.*, 2012; Danscher *et al.*, 2015). As fezes apresentam-se frequentemente mais líquidas, de coloração amarelada, com odor agri-doce e partículas alimentares não digeridas (Dirksen, 1985; Oetzel, 2000; Plaizier *et al.*, 2017), refletindo disfunções fermentativas e maior fluxo de amido não degradado para o intestino grosso (Plaizier *et al.*, 2017).

O pH fecal também pode contribuir para o diagnóstico: valores abaixo de 6,0 são compatíveis com SARA (Danscher *et al.*, 2015; Chaudhry *et al.*, 2018; Voulgarakis *et al.*, 2023). A avaliação do escore fecal também é útil, sendo que fezes com escore ≤ 2 , em escala de 1 a 5, sugerem distúrbios ruminais.

A mensuração do pH sanguíneo, embora menos específica, pode indicar distúrbios metabólicos secundários à SARA. Valores entre 7,10 e 7,34 têm sido observados em bovinos acometidos, sugerindo acidose metabólica leve, acompanhada por queda do bicarbonato plasmático, do excesso de base e do conteúdo total de CO₂, além de aumento do ânion gap (Sabes *et al.*, 2017; Snyder & Credille, 2017). Proteínas de fase aguda, como haptoglobina e proteína C reativa, também têm sido avaliadas como biomarcadores complementares, dada sua associação com a inflamação sistêmica observada na SARA (Gonzalez *et al.*, 2010; Zebeli *et al.*, 2012; Nikvand *et al.*, 2020).

Em síntese, o diagnóstico da SARA exige uma abordagem integrada e criteriosa, que combine dados clínicos, observações comportamentais, análises laboratoriais e ferramentas tecnológicas, de modo a identificar precocemente alterações compatíveis com distúrbios fermentativos ruminais e prevenir consequências produtivas e inflamatórias associadas.

2.4 Consequências Produtivas

A acidose ruminal, particularmente em sua forma subaguda - SARA, está fortemente associada à redução na produção de leite em vacas leiteiras (Golder & Lean, 2024). Essa condição é caracterizada pela queda persistente do pH ruminal abaixo de 5,8 por períodos prolongados, o que compromete a atividade dos microrganismos celulolíticos, reduz a digestibilidade da fibra e altera a produção de AGV, com menor proporção de acetato e maior produção de propionato e lactato (Nagaraja & Titgemeyer, 2007; Elmhadi *et al.*, 2022).

Como o acetato é o principal precursor da síntese de gordura do leite, sua redução impacta diretamente a produção e a composição do leite (Bauman & Griinari, 2003; Gao & Oba, 2016). Simultaneamente, o aumento na produção de propionato e lactato, associado à liberação de endotoxinas bacterianas, desencadeia respostas inflamatórias sistêmicas que desviam nutrientes do metabolismo produtivo para a defesa imune e o reparo tecidual (Mu *et al.*, 2023). Alterações no padrão fermentativo também comprometem a síntese de proteína microbiana, reduzindo o suprimento de proteína metabolizável à glândula mamária (Krause & Oetzel, 2006; Mu *et al.*, 2023).

Além disso, a SARA reduz a ruminação e a salivação, importantes mecanismos naturais de tamponamento ruminal. O menor CMS, a queda na eficiência alimentar e a redução da produção de leite tornam-se consequências diretas da acidose ruminal (Srivastava *et al.*, 2021).

Estudos experimentais ilustram bem essas perdas. Khafipour *et al.* (2009) relataram queda de 3,5 kg/dia na produção de leite durante a indução de SARA, com produção reduzida de 35,2 para 31,7 kg/dia. Esses achados foram confirmados posteriormente pelos mesmos autores (Khafipour *et al.*, 2009), utilizando diferentes protocolos de indução. Em uma avaliação mais recente, Gao & Oba (2016) identificaram uma queda de aproximadamente 0,5 kg de leite para cada 0,1 unidade de redução no pH ruminal, evidenciando a sensibilidade da lactação a desequilíbrios ácido-base no rúmen.

Antanaitis *et al.* (2024) observaram uma redução média de 10,49% na produção de leite em vacas diagnosticadas com SARA. Considerando uma vaca com 35 kg/dia de produção, essa perda representaria cerca de 3,67 kg/dia, em consonância com os valores de Khafipour *et al.* (2009). De forma complementar, DeVries *et al.* (2018) constataram que vacas em risco de SARA apresentaram produção corrigida para 4% de gordura (4% FCM) 5,3 kg/dia inferior à de vacas saudáveis (41,9 vs. 47,2 kg/dia).

Vale destacar que essas perdas são frequentemente subestimadas devido ao caráter subclínico do distúrbio, que não se manifesta por sinais clínicos evidentes, mas compromete cronicamente a eficiência produtiva. Esse impacto decorre de múltiplos mecanismos fisiológicos inter-relacionados (Golder & Lean, 2024).

2.5 Estratégias de Prevenção e Controle da Acidose Ruminal

A acidose ruminal pode ser prevenida por meio de estratégias de manejo nutricional voltadas à manutenção da estabilidade do ambiente ruminal (Elmhadi *et al.*, 2022). Uma das práticas mais importantes é a inclusão de níveis adequados de fibra fisicamente efetiva, fundamental para estimular a mastigação e a salivação, promovendo o tamponamento natural do rúmen por meio da ação do bicarbonato presente na saliva (Enemark, 2008, Xu *et al.*, 2018).

Dietas bem formuladas devem equilibrar o teor de fibra e amido, mantendo uma proporção adequada entre a fibra fisicamente efetiva (peNDF) e o amido degradável no rúmen (RDS). Recomenda-se cerca de 15% de RDS total e 30–32% de peNDF com partículas >1,18 mm para manter o pH ruminal médio em 6,2, proporções de peNDF:RDS inferiores a 1,45 devem ser evitadas (Zebeli *et al.*, 2010; Ishaq *et al.*, 2017, Elmhadi *et al.*, 2022). Além disso, o manejo alimentar deve incluir partículas longas (7–15% da dieta total) para estimular a salivacão e a ruminação, reduzindo a ocorrência de SARA. (Ishaq *et al.*, 2017, Elmhadi *et al.*, 2022).

Outro fator essencial é a adaptação gradual dos animais a dietas ricas em concentrados, o que permite uma transição fisiológica adequada e mudanças progressivas na microbiota ruminal, evitando desequilíbrios fermentativos abruptos (Millen *et al.*, 2016; Kachhadia *et al.*, 2023). Recomenda-se que esse processo de adaptação ocorra ao longo de 7 a 10 dias (Evci, 2024). Além disso, a oferta regular e estável de alimentos, evitando longos períodos de jejum, seleção de partículas e flutuações na oferta de concentrados, também é crucial para manter a estabilidade da fermentação ruminal (Evci, 2024). Também se destaca a importância de fornecer espaço adequado nos cochos, medida que minimiza comportamentos competitivos, reduz o risco de ingestão excessiva e contribui para a prevenção de distúrbios digestivos (Sommai *et al.*, 2020; Trotta *et al.*, 2021).

No que diz respeito ao manejo hídrico, a oferta contínua de água limpa e em quantidade suficiente é essencial para manter o pH e a função ruminal, devendo-se também monitorar sua qualidade (Millen *et al.*, 2016; Huot *et al.*, 2023; Kachhadia *et al.*, 2023).

Fatores ambientais estressantes, como transporte ou exposição ao calor intenso, devem ser evitados, visto que afetam negativamente a homeostase ruminal. A adequação da ventilação nos ambientes de confinamento é fundamental para minimizar o estresse térmico e preservar a saúde dos animais (Fu *et al.*, 2022; Evci, 2024).

Além dessas medidas, o uso de aditivos alimentares pode ser uma estratégia complementar eficaz. Entre os mais utilizados, destacam-se os ionóforos (como a monensina), que modulam a fermentação ruminal favorecendo a produção de

propionato e reduzindo a produção de lactato (Evcı et al., 2025). Óleos essenciais, como o cinamaldeído e o eugenol, vêm sendo estudados como alternativas naturais com efeito antimicrobiano seletivo sobre bactérias produtoras de lactato (Xia et al., 2020).

O uso de probióticos, como o *Saccharomyces cerevisiae*, também é recomendado por sua capacidade de estabilizar o ambiente ruminal, estimular o crescimento de bactérias celulolíticas e consumir oxigênio residual, criando um ambiente mais favorável para microrganismos anaeróbios (Hernández et al., 2014). A suplementação de tiamina também é uma estratégia para mitigar a SARA, pois modula a microbiota ruminal, reduz a inflamação local e protege o epitélio ruminal de fissuras. Estudos demonstraram que a tiamina diminui a expressão de marcadores inflamatórios como IL-1 β e subunidades do NF- κ B no epitélio ruminal (Zhang et al., 2020; Ma et al., 2021).

O uso de extratos vegetais ricos em compostos bioativos, como flavonoides e polifenóis também têm demonstrado potencial para modular positivamente a microbiota ruminal, reduzir o estresse oxidativo, regular processos inflamatórios e fortalecer a resposta imune dos animais (Gessner et al., 2020). Combinações específicas de extratos, incluindo naringina, ácido glicirretínico e extrato de canela, mostraram-se eficazes em elevar o pH ruminal, promover o equilíbrio da comunidade bacteriana e suprimir reações inflamatórias, contribuindo assim para o controle da SARA (Rivera-Chacon et al., 2022).

O uso de agentes tamponantes é uma das abordagens mais eficazes para mitigar variações no pH ruminal, especialmente em dietas com alto teor de amido (Golden et al., 2023). Essa prática remonta à década de 1960, com o aumento da inclusão de concentrados nas dietas (Ramos et al., 2022).

O bicarbonato de sódio (NaHCO_3) é tampão mais amplamente utilizado na alimentação de ruminantes (Neville et al., 2022). É considerado um tampão “verdadeiro” pelo seu pKa ser bastante próximo do pH fisiológico adequado do rúmen, por possuir alta solubilidade no rúmen, o que permite rápida diluição no líquido e maior efetividade de ação. Sua ação é rápida e eficaz na neutralização de ácidos, essa ação se dá pela ligação a 1 próton (H^+) e forma ácido carbônico (H_2CO_3), que se

decompõe em água e dióxido de carbono, isso remove H^+ do ambiente, elevando o pH (Plaizier *et al.*, 2008).

Em dietas de alto concentrado, comumente utilizadas em sistemas intensivos de produção de carne e leite, a inclusão $NaHCO_3$ é recomendada na proporção de 0,75% a 1,2% da matéria seca total da dieta (Plaizier *et al.*, 2008). No entanto, sua capacidade tamponante é de curta duração, o que pode limitar sua eficácia ao longo do dia, principalmente em dietas de alta carga fermentativa, exigindo suplementações regulares para manutenção de sua eficácia (Erdman, 1988). Ademais, doses elevadas podem acarretar alterações no equilíbrio eletrolítico, especialmente pelo aumento das concentrações séricas de sódio, podendo, em alguns casos, reduzir a ingestão voluntária de alimento (Erdman *et al.*, 1982).

O óxido de magnésio (MgO) possui maior capacidade neutralizante e uma ação mais duradoura em comparação ao bicarbonato, sendo eficaz na elevação do pH ruminal. Como uma base forte de baixa solubilidade, o MgO se converte em hidróxido de magnésio ($Mg(OH)_2$) ao entrar em contato com a água do rúmen. Esse composto libera íons hidroxila (OH^-), que reagem com os íons H^+ livres, formando moléculas de água (H_2O) e, assim, diminuindo a acidez ruminal (Neiderfer *et al.*, 2020). Embora a ação tamponante do MgO seja lenta devido à sua baixa solubilidade, sua duração mais prolongada é vantajosa em dietas com risco de acidose subaguda (Arce-Cordero *et al.*, 2022). No entanto, seu uso deve ser controlado, pois o excesso pode causar desequilíbrios eletrolíticos e resultar em alcalose metabólica (Kertz *et al.*, 1984).

O carbonato de cálcio ($CaCO_3$), por sua vez, também apresenta baixa solubilidade, mas reage com maior intensidade em meios ácidos. Em condições de pH ruminal reduzido, o $CaCO_3$ reage diretamente com os íons H^+ , liberando íons cálcio (Ca^{2+}), dióxido de carbono (CO_2) e água, essa reação permite que cada molécula de carbonato de cálcio neutralize dois íons H^+ , contribuindo efetivamente para o tamponamento do ambiente ruminal (Rossi *et al.*, 2019; Neiderfer *et al.*, 2020).

Nos últimos anos, ganhou destaque o uso de tampões naturais, como os derivados de algas marinhas calcificadas, especialmente do gênero *Lithothamnium* (Loučka *et al.*, 2024). Estas algas possuem uma estrutura porosa rica em carbonatos de cálcio e magnésio (Neville *et al.*, 2019). Sua principal vantagem está na liberação

gradual dos minerais, o que proporciona um tamponamento mais estável ao longo do tempo, essa propriedade é particularmente desejável para dietas com alto potencial fermentativo, nas quais as flutuações bruscas de pH representam um risco metabólico significativo (Cruywagen *et al.*, 2015). Além do efeito sobre o pH, as algas calcárias fornecem cálcio e magnésio de alta biodisponibilidade, contribuindo para a mineralização óssea e a atividade enzimática dos animais (Cruywagen *et al.*, 2015).

Desse modo, a prevenção da SARA envolve a integração de múltiplas estratégias que, em conjunto, otimizam a saúde ruminal, reduzem a incidência de distúrbios metabólicos e promovem o desempenho produtivo dos ruminantes (Elmhadi *et al.*, 2022; Voulgarakis *et al.*, 2023).

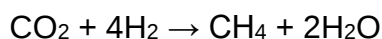
3 Produção de Metano em Ruminantes

3.1 Metanogênese Ruminal: Arqueias e Destino do Hidrogênio

A microbiota ruminal é composta por uma ampla diversidade de microrganismos, incluindo bactérias, protozoários, fungos, vírus bacteriófagos e arqueias metanogênicas (Behlke *et al.*, 2007). Bactérias, protozoários e fungos exercem papel essencial na degradação dos carboidratos estruturais das plantas, liberando açúcares fermentescíveis. Esses açúcares são então convertidos em ácidos graxos voláteis (AGV), principalmente acetato, propionato e butirato, além de menores quantidades de valerato, iso-butirato, iso-valerato e caproato (Choudhury *et al.*, 2015). Os AGV são absorvidos e utilizados pelo animal como principal fonte de energia, por meio da síntese de ATP (McCauley *et al.*, 2020).

Durante esse processo fermentativo, são gerados subprodutos como dióxido de carbono (CO_2), hidrogênio molecular (H_2) e equivalentes reduzidos como NADH e FADH_2 (Behlke *et al.*, 2007). Devido ao ambiente estritamente anaeróbico do rúmen, a reoxidação desses equivalentes não pode ocorrer por vias respiratórias clássicas, sendo substituída por rotas metabólicas alternativas, entre as quais a metanogênese se destaca como uma via crítica para a manutenção do equilíbrio redox. A rápida remoção do H_2 livre é essencial para evitar sua acumulação, que poderia inibir a atividade de microrganismos fermentadores, como as bactérias celulolíticas (McCauley *et al.*, 2020).

Nesse contexto, as arqueias metanogênicas assumem papel fundamental ao utilizarem o H₂ como doador de elétrons na produção de CH₄, contribuindo para a regulação da pressão parcial de hidrogênio no ambiente ruminal (McAllister & Newbold, 2008). A via predominante de produção de CH₄ no rúmen é a hidrogenotrófica, na qual o CO₂ atua como aceptor de elétrons, conforme a equação:



Essa rota responde por aproximadamente 82% do metano produzido no rúmen (Króliczewska *et al.*, 2023). Os principais gêneros de arqueias metanogênicas presentes no rúmen incluem *Methanobrevibacter* (63,2%), *Methanosphaera* (9,8%) e *Methanomicrobium* (7,7%), seguidos por gêneros menos prevalentes como *Methanimicrococcus*, *Methanosarcina* e *Methanobacterium* (Danielsson *et al.*, 2017).

Outras vias de metanogênese incluem a acetoclástica e a metilotrófica. A primeira envolve a conversão de acetato em CH₄ (CH₃COOH → CH₄ + CO₂), sendo mais comum em ambientes como reatores anaeróbicos ou sedimentos, e de participação restrita no rúmen devido à competição com bactérias acetogênicas (Berghuis *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2025). Já a metilotrófica envolve a utilização de compostos metilados, como metanol e metilaminas, por arqueias especializadas que produzem CH₄ por meio de reações como: 4CH₃OH → 3CH₄ + CO₂ + 2H₂O ou CH₃NH₂ + H₂O → CH₄ + NH₃ + H₂O (Berghuis *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2025).

A disponibilidade de H₂ livre é um fator determinante da intensidade da metanogênese ruminal. No entanto, o H₂ pode ser redirecionado para vias metabólicas alternativas que competem com a produção de CH₄, como a síntese de propionato ou a redução de ânions como nitrato (NO₃⁻) e sulfato (SO₄²⁻) (Lan & Yang, 2019). A formação de propionato, por exemplo, atua como um sumidouro de hidrogênio, consumindo H₂ nas vias do succinato-fumarato ou do acrilil-CoA, esta última passando pela conversão de piruvato em lactato e sua posterior redução (Baldwin & Allison, 1983). Há uma correlação negativa bem estabelecida entre a produção de propionato e a de metano no rúmen (Kobayashi, 2010; Lan & Yang, 2019).

De maneira semelhante, a redução de nitrato a amônia e de sulfato a sulfeto de hidrogênio constitui rotas alternativas que também consomem H_2 , embora sua eficácia dependa da disponibilidade dietética desses compostos. Assim, o metano funciona como uma rota terminal para o escape bioquímico do hidrogênio acumulado, sendo crucial para o equilíbrio fermentativo e redox do rúmen (McAllister *et al.*, 1996; McCauley *et al.*, 2020).

3.2 Impactos da Emissão de Metano (CH_4)

A maior parte do CH_4 produzido no rúmen é eliminada por eructação, sendo liberada pela boca diretamente a partir do espaço gasoso ruminal (Hill *et al.*, 2016). Contudo, estima-se que aproximadamente 10% a 15% do metano possa ser excretado por outras vias, como pela respiração ou pela flatulência, resultado da fermentação microbiana no intestino grosso (Huhtanen *et al.*, 2015).

Do ponto de vista energético, o CH_4 representa uma perda considerável para o animal. Calcula-se que entre 2% e 12% da energia metabolizável ingerida seja dissipada na forma de metano eructado (Morgavi *et al.*, 2010; Roque *et al.*, 2019). Essa perda reduz a eficiência alimentar dos ruminantes, limitando o aproveitamento energético dos nutrientes da dieta.

Além das implicações zootécnicas, a emissão de CH_4 entérico representa uma significativa preocupação ambiental. O metano possui um potencial de aquecimento global (Global Warming Potential – GWP) aproximadamente 28 vezes superior ao do CO_2 em um horizonte de 100 anos, conforme relatado pelo IPCC (2014) e corroborado por Gerber *et al.* (2013) e Simanungkalit *et al.* (2023). Estima-se que o setor pecuário seja responsável por cerca de 14,5% a 18% das emissões globais antropogênicas de gases de efeito estufa (GEE), com aproximadamente 3,1 gigatoneladas de equivalentes de CO_2 emitidas anualmente sob a forma de metano — sendo o metano entérico a principal fonte isolada dessas emissões (Grossi *et al.*, 2019; Kinley *et al.*, 2020; Bhowmick & Hayes, 2023).

Entre os ruminantes, os bovinos, especialmente vacas leiteiras e bovinos de corte são os maiores emissores. De acordo com Sejian *et al.* (2011) e McCauley *et al.* (2020), uma vaca pode emitir até 98,6 kg de CH_4 por ano, embora esse valor varie

conforme fatores como espécie, raça, composição da dieta, microbiota ruminal e consumo de matéria seca. Estimativas similares apontam que cada animal pode liberar anualmente cerca de 3 toneladas de CO₂ equivalente, conforme descrito por Grossi *et al.* (2019) e Bhowmick & Hayes (2023).

Apesar desse impacto ambiental expressivo, a pecuária continua a desempenhar um papel central na segurança alimentar global, fornecendo proteínas de alto valor biológico, ácidos graxos essenciais e micronutrientes relevantes à saúde humana (Bhowmick & Hayes, 2023). Dessa forma, torna-se imperativo adotar estratégias de manejo sustentáveis que conciliem a redução das emissões de GEE com a manutenção da produtividade e da viabilidade econômica dos sistemas de produção (Negussie *et al.*, 2017; Wanapat *et al.*, 2024).

Dentre as estratégias nutricionais mais promissoras para a mitigação das emissões de metano entérico, destacam-se o uso de aditivos naturais e sintéticos com ação antimicrobiana ou inibidora da atividade metanogênica (Króliczewska *et al.*, 2023). Compostos como ionóforos, probióticos, óleos essenciais, lipídios, extratos vegetais ricos em taninos, saponinas e florotaninos, além de macroalgas e substâncias halogenadas, têm demonstrado capacidade de interferir na atividade dos microrganismos metanogênicos, promovendo alterações desejáveis no padrão fermentativo ruminal e resultando em menores emissões de CH₄ (Ampapon *et al.*, 2022; Wanapat *et al.*, 2024; Liu *et al.*, 2025).

3.3 Estratégias de Mitigação

A produção de CH₄ no rúmen está intrinsecamente relacionada ao metabolismo do hidrogênio (H₂), um subproduto da fermentação microbiana de carboidratos (Wanapat *et al.*, 2024). A remoção eficiente do H₂ é essencial para a regeneração do NAD⁺ e continuidade da fermentação anaeróbia (Króliczewska *et al.*, 2023). Nesse cenário, a metanogênese exerce papel fundamental, sendo conduzida principalmente por arqueias metanogênicas que utilizam H₂ para reduzir CO₂, formando CH₄ (Króliczewska *et al.*, 2023). Portanto, estratégias nutricionais e tecnológicas que modulam a produção e o destino do H₂ no rúmen representam alternativas promissoras para mitigar as emissões entéricas de CH₄, desde que não comprometam a digestibilidade e a saúde dos animais (Martin *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2015).

A composição da dieta influencia diretamente a produção de CH_4 . Dietas ricas em fibras favorecem a formação de acetato, que libera H_2 , enquanto dietas com mais amido estimulam a síntese de propionato, que consome H_2 e reduz a produção de metano (Shibata & Terada, 2010). Além disso, dietas com alto teor de concentrado reduzem o pH ruminal, inibindo arqueias metanogênicas e protozoários ciliados simbióticos (Golder & Lean, 2024). Contudo, o excesso de concentrado pode levar à acidose ruminal, redução na gordura do leite e menor longevidade produtiva (Johnson et al., 2002). Além das implicações zootécnicas, há impactos ambientais a considerar, como o aumento das emissões de CO_2 e N_2O associadas à produção e transporte de grãos, que podem anular os benefícios da redução de CH_4 entérico (Johnson et al., 2002).

Práticas de manejo forrageiro, como o controle da massa de forragem pré-pastejo, também afetam as emissões de metano. Pastagens de melhor qualidade nutricional e com menor teor de fibra promovem maior ingestão e digestibilidade, resultando em menor emissão de CH_4 por unidade de produto (WCMS et al., 2010). Ainda, a conservação da forragem por meio de silagem e o seu processamento físico (moagem, peletização) podem reduzir a metanogênese devido ao aumento na taxa de passagem e menor tempo de fermentação ruminal (Beauchemin et al., 2008).

Aditivos naturais como probióticos, saponinas, taninos e óleos essenciais podem reduzir a produção de metano entérico em ruminantes ao modularem a fermentação ruminal e a microbiota (Islam & Lee, 2019). Probióticos como *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactobacillus spp.* competem por H_2 , redirecionando o metabolismo para vias menos metanogênicas (Islam & Lee, 2019; Broucek, 2018; Króliczewska et al., 2023). Saponinas reduzem protozoários que hospedam arqueias metanogênicas e aumentam a eficiência microbiana (Goel et al., 2008; Wang et al., 2025). Taninos, especialmente os condensados, formam complexos com nutrientes e inibem a atividade microbiana, limitando a produção de H_2 (Aboagye & Beauchemin, 2019; Denninger et al., 2020; Min et al., 2020). Por fim, os óleos essenciais, compostos aromáticos ricos em terpenos e fenóis, alteram a microbiota ruminal e a produção de ácidos graxos voláteis (AGV), reduzindo as populações de arqueias metanogênicas, embora seus efeitos dependam do tipo, da dose e da interação com a dieta, (Calsamiglia et al., 2007; Tedeschi et al., 2022; Foggi et al., 2024).

4 *Lithothamnium calcareum*: Uma Estratégia Dupla

4.1 Composição Química e Ação como Tampão

Lithothamnium calcareum é uma alga vermelha calcária pertencente ao filo Rhodophyta, ordem Corallinales e família Hapalidiaceae, de crescimento extremamente lento e habitat em águas marinhas frias e profundas (Neville *et al.*, 2019). Durante seu processo biológico de calcificação, essa macroalga incorpora elevadas quantidades de carbonatos de cálcio (CaCO_3) e de magnésio (MgCO_3), predominantemente na forma de minerais polimórficos como calcita, aragonita e, especialmente, magnésio-calcita — uma forma estruturalmente porosa e altamente reativa (Cruywagen *et al.*, 2015; Neville *et al.*, 2022). Além desses componentes majoritários, a alga contém vestígios de oligoelementos como zinco, manganês, cobre, ferro e selênio, que, embora presentes em baixas concentrações, participam de processos metabólicos relevantes para a saúde animal (Neville *et al.*, 2019).

Apesar de seu uso crescente na nutrição de ruminantes, o *Lithothamnium calcareum* não contém compostos bioativos específicos ou metabólitos secundários funcionais — como polifenóis, saponinas ou óleos essenciais — que caracterizam outros aditivos naturais. Sua ação está restrita ao efeito físico-químico exercido por seus sais minerais, sobretudo na capacidade tamponante no ambiente ruminal (Guerreiro *et al.*, 2025).

A estrutura altamente porosa da alga favorece uma liberação lenta e sustentada dos íons Ca^{2+} e Mg^{2+} , prolongando sua eficácia tamponante em comparação com fontes solúveis como bicarbonato de sódio ou óxido de magnésio (Cruywagen *et al.*, 2015). Essa liberação gradual é especialmente benéfica em dietas com alta proporção de amido, nas quais há maior produção de AGV e ácido láctico, promovendo quedas bruscas de pH ruminal. Ao atenuar essas oscilações, o *Lithothamnium calcareum* contribui para a manutenção da estabilidade do ambiente ruminal e para a preservação da microbiota celulolítica, favorecendo a digestibilidade da fibra (Neville *et al.*, 2022).

No entanto, é importante destacar que *Lithothamnium calcareum* é um recurso natural limitado, cuja formação ocorre em escalas geológicas, ao longo de milhares de anos. Sua extração, especialmente por dragagem do fundo oceânico, pode gerar

impactos ambientais significativos em ecossistemas marinhos sensíveis (Hall-Spencer *et al.*, 2003; Dutertre *et al.*, 2015). Portanto, seu uso na produção animal deve ser pautado por critérios técnicos e ambientais bem fundamentados, priorizando o equilíbrio entre eficiência zootécnica e conservação dos recursos naturais. Nesse contexto, a viabilidade de seu uso em larga escala depende diretamente da adoção de estratégias de manejo sustentável e regulamentação adequada da atividade extrativa.

4.2 Efeitos sobre o Rúmen e a Microbiota

Estudos em vacas leiteiras demonstram que a inclusão de *Lithothamnium calcareum* na dieta é capaz de elevar o pH ruminal e reduzir o tempo de permanência do conteúdo ruminal em valores críticos de acidez ($\text{pH} < 5,5$), o que é fundamental para preservar a integridade da mucosa ruminal e manter a atividade das bactérias celulolíticas (Cruywagen *et al.*, 2015; Neville *et al.*, 2019; 2022). Essa estabilização do ambiente ruminal contribui para uma fermentação mais eficiente dos carboidratos fibrosos e para a redução da produção excessiva de ácido lático, prevenindo disbioses e favorecendo a absorção adequada de ácidos graxos voláteis (AGV), especialmente o acetato — principal precursor da síntese de gordura no leite. Como consequência, observa-se melhora na composição do leite, com aumento do teor de gordura e de sólidos totais, bem como elevação na produção de leite corrigida para energia (ECM) e na eficiência alimentar (Cruywagen *et al.*, 2015; Neville *et al.*, 2019; 2022). Além disso, efeitos fisiológicos pós-ruminais também foram identificados, como o aumento do pH fecal, sugerindo um menor fluxo de amido não degradado ao intestino grosso e, portanto, uma fermentação intestinal mais equilibrada (Neiderfer *et al.*, 2020).

Durante o período de transição, *Lithothamnium calcareum* demonstrou benefícios em termos de balanço energético, status mineral e marcadores inflamatórios (Neville *et al.*, 2022; Wu *et al.*, 2015). Em bovinos de corte, observou-se modulação favorável da microbiota ruminal, estabilidade metabólica e possível mitigação de distúrbios como a acidose ruminal subaguda (Lima *et al.*, 2023). A combinação com monensina e óleos essenciais potencializou o desempenho zootécnico e a qualidade da carcaça (Guerreiro *et al.*, 2025).

No entanto, os resultados sobre produção leiteira não são unânimes. Alguns estudos não observaram diferenças significativas (Bernard *et al.*, 2014; Calitz, 2009),

apontando que os efeitos podem variar conforme composição da dieta, fase fisiológica e apresentação do suplemento (Sharma *et al.*, 2018).

Além da função tamponante e nutricional, *Lithothamnium calcareum* também apresenta efeitos sistêmicos relevantes (De Vos, 2019). Minerais funcionais presentes na alga, como selênio, zinco e magnésio, têm sido associados à melhora do estado antioxidante e à modulação da resposta inflamatória. Em vacas leiteiras suplementados no pós-parto, observou-se redução de marcadores inflamatórios como haptoglobina e proteína C reativa (Neville *et al.*, 2022), especialmente importante em fases críticas como a transição, lactação inicial ou crescimento acelerado, em que o estresse oxidativo pode afetar a imunidade e a longevidade produtiva.

Recentes evidências indicam que tamponantes de origem marinha, ao estabilizarem o pH ruminal, reduzem a lise bacteriana excessiva e a liberação de LPS, minimizando sua translocação para a corrente sanguínea, um dos principais gatilhos da resposta inflamatória sistêmica (Khafipour *et al.*, 2009). Com isso, há menor ativação do sistema imune, menor produção de proteínas de fase aguda (como a haptoglobina e a proteína amiloide A) e potencial redução nos impactos negativos sobre fígado, reprodução e produtividade (Bradford *et al.*, 2015).

4.3 Potencial na Mitigação de Metano

A inclusão de algas na alimentação de ruminantes é uma estratégia crescente para mitigação de CH₄ entérico (Liu *et al.*, 2025). Algas vermelhas como *Asparagopsis taxiformis* possuem bromoformo, que inibe a enzima metil-coenzima M redutase (MCR), bloqueando a etapa final da metanogênese, com reduções de até 98–99% nas emissões (Machado *et al.*, 2016; Roque *et al.*, 2021).

Embora o efeito das algas vermelhas esteja fortemente associado à ação direta do bromoformo, outras macroalgas, como as marrons (*Phaeophyceae*) e verdes (*Chlorophyta*), apresentam efeitos mitigadores mais modestos, geralmente inferiores a 50%, com exceção de algumas espécies, como *Dictyota bartayresii* e *Cystoseira trinodis*, que atingem até 92% e 80% de redução em condições *in vitro* (Dubois *et al.*, 2013; Machado *et al.*, 2014). Nesses casos, a ação antimicrobiana é atribuída a compostos como florotaninos, saponinas e alcaloides, que podem atuar como

sumidouros de hidrogênio (H_2), reduzindo sua disponibilidade para metanogênese e favorecendo vias fermentativas alternativas, como a produção de propionato (Martinez-Fernandez *et al.*, 2017). Dessa forma, enquanto algas vermelhas atuam por inibição enzimática direta, algas marrons e verdes promovem modulação indireta da fermentação ruminal e da microbiota, contribuindo para a redução das emissões entéricas (Liu *et al.*, 2025).

Já o *Lithothamnium calcareum*, apesar de não conter compostos halogenados como o bromoformo, pode influenciar a produção de CH_4 por mecanismos indiretos. Seu efeito tamponante estabiliza o pH ruminal, favorecendo fermentações mais eficientes e redirecionando a produção de hidrogênio para rotas menos metanogênicas, como a formação de propionato (Simanungkalit *et al.*, 2023). Minerais como cálcio e magnésio podem também modular a microbiota e inibir populações metanogênicas específicas (Guerreiro *et al.*, 2025).

Em sistemas intensivos de terminação, a combinação da alga com monensina resultou em redução mais significativa das emissões de metano do que o uso isolado de óleos essenciais. Contudo, os efeitos isolados da alga ainda não são totalmente conclusivos. Simanungkalit *et al.* (2023) observaram que, embora o suplemento com *Lithothamnium calcareum* tenha estabilizado o pH ruminal, as emissões de CH_4 foram superiores às observadas com monensina.

Por fim, a utilização de *Lithothamnium calcareum* tem sido promovida por empresas do setor como uma alternativa sustentável aos tampões minerais convencionais, com alegações de que sua extração ocorre de forma controlada, com baixo impacto ambiental e características renováveis. Essas propriedades o inserem no contexto de práticas agropecuárias mais alinhadas à redução do uso de insumos químicos e à produção animal de menor impacto ambiental (Loučka *et al.*, 2024). No entanto, trata-se de um recurso marinho de crescimento lento, cuja exploração indiscriminada pode representar riscos à biodiversidade e à regeneração natural dos bancos de algas (Hall-Spencer *et al.*, 2003; Dutertre *et al.*, 2015).

Assim, embora o *Lithothamnium calcareum* apresente vantagens funcionais como agente tamponante e potencial modulador da microbiota ruminal, sua utilização deve ser acompanhada de protocolos de manejo sustentável, fiscalização ambiental

e transparência na origem, de forma a garantir que seus benefícios zootécnicos não comprometam a integridade dos ecossistemas marinhos (Loučka *et al.*, 2024).

4 Desenvolvimento

4.1 Manuscrito 1

Comparison of marine algae-based rumen buffer with sodium bicarbonate buffer and its role in increasing milk value

- Artigo Científico -

Magna F. B. Savela, Laura V. Vieira, Jaqueline G. Fischer, Eliza R. Komninou, Francisco A. B. Del Pino, Cássio C. Brauner, Antônio A. Barbosa, Alysson P. Silveira, Graziela S. Boer and Marcio N. Corrêa

Research, Teaching and Extension Center in Livestock (NUPEEC), Federal University of Pelotas (UFPel), 96160-000, Pelotas, Brazil

Artigo publicado no periódico: Journal of Dairy Research

Comparison of marine algae-based rumen buffer with sodium bicarbonate buffer and its role in increasing milk value

Research Article

Cite this article: Savela MFB *et al.* Comparison of marine algae-based rumen buffer with sodium bicarbonate buffer and its role in increasing milk value. *Journal of Dairy Research* <https://doi.org/10.1017/S0022029925000081>

Received: 19 July 2023

Revised: 20 June 2024

Accepted: 6 July 2024

Keywords:

Feeding behaviours; *Lithothamnium calcareum*; productivity; rumen buffer

Corresponding author:

Magna F. B. Savela;

Email: fabibrasil93@gmail.com

Magna F. B. Savela, Laura V. Vieira, Jaqueline G. Fischer, Eliza R. Komninou, Francisco A. B. Del Pino, Cássio C. Brauner, Antônio A. Barbosa, Alysson P. Silveira, Graziela S. Boer and Marcio N. Corrêa

Research, Teaching and Extension Center in Livestock (NUPEEC), Federal University of Pelotas (UFPel), 96160-000, Pelotas, Brazil

Abstract

This study aimed to evaluate the effect of marine-based rumen buffer (*Lithothamnium calcareum*) supplementation on rumen health as well as milk yield and composition and also behavioural and metabolic parameters of dairy cows. Thirty-six lactating multiparous Holstein cows were used with a milk yield average of 39 kg/d and 64 d in milk. The experiment was conducted over 60 d using two groups: control (CON; $n = 18$) was supplemented with sodium bicarbonate at 1.1% dry matter and a treatment group that received *Lithothamnium calcareum* at 0.5% of dry matter (LITHO; $n = 18$). Each group was fed daily with the buffers mixed to the total mixed ration containing 29.28% starch. Ruminal fluid collections were performed weekly to evaluate pH and volatile fatty acids. Feeding behaviour data were obtained through automatic feeders, while overall behavioural data were obtained using monitoring collars. Milk yield was recorded daily and adjusted for fat and energy. Milk samples were retrieved once weekly for analysis of fat, protein, lactose and total solids. Blood samples were collected weekly for metabolic analysis and faecal samples were collected weekly to evaluate pH and starch concentrations. LITHO produced more fat- and energy-corrected milk ($P \leq 0.01$) as well as the highest percentage of fat and solids ($P < 0.05$) when compared to the CON group. Data on feeding behaviour showed an increased eating time ($P \leq 0.01$) in the LITHO group but a higher eating rate ($P < 0.01$) in the CON group. Animals from the LITHO group had lower faecal pH ($P < 0.05$). The treatment did not affect dry matter intake, animal behaviour, ruminal acid–base balance, or faecal starch. In summary, *Lithothamnium calcareum* supplementation at 0.5% of dry matter improved milk yield, milk composition and, presumably, feed conversion efficiency.

To meet the high nutritional demands, increase production and improve profitability, cattle feeding programs recommend starch-rich diets, especially in the beginning and middle of lactation (Mu *et al.*, 2023). Starch is an important energy source for dairy cows to meet microbial protein production goals in the rumen and milk yield demands (Srivastava *et al.*, 2021). However, the supply of rapidly fermentable starch in the rumen can result in the accumulation of volatile fatty acids (VFA), harming ruminal health (Mawda *et al.*, 2022). Increased VFA production, which exceeds the buffering supply, disrupts the intraruminal acid–base balance, reducing ruminal pH and leading to an acidotic environment (Golder *et al.*, 2023). This change in the rumen significantly decreases the activity of fibrolytic bacteria, reducing the acetate concentration, which plays an essential role in stimulating the synthesis of milk fat (Neville *et al.*, 2019; Martins *et al.*, 2021).

Considering this, maintenance of the ruminal conditions is vital to ensure healthy and efficient milk yield. Thus, ruminal buffers are commonly added to the diets of lactating cows to avoid prolonged episodes of low ruminal pH and the associated production losses (Bach *et al.*, 2018; Srivastava *et al.*, 2021). Sodium bicarbonate is the most popular dietary buffer used in ruminant nutrition, to neutralize acidity and stabilize ruminal pH (Chalupa *et al.*, 1996; Cruywagen *et al.*, 2015). However, it is a soluble buffer with a short duration in the rumen that may not effectively buffer the ruminal environment (Van Soest, 1994). Consequently, marine algae have recently been studied as a potential supplement to stabilize ruminal pH due to their polymorphic nature (honeycomb structure). These organisms provide a slow release of minerals (calcium and magnesium) in an acidic environment, prolonging their neutralizing action on ruminal pH and avoiding prolonged episodes of low pH (Cruywagen *et al.*, 2015; Neville *et al.*, 2019). LithoNutri is a natural and renewable food additive produced from the marine algae *Lithothamnium calcareum* which is rich in calcium (Ca) and magnesium (Mg) carbonate (Guerreiro *et al.*, 2019). Its release of Ca and Mg is slower in the ruminal

© The Author(s), 2025. Published by Cambridge University Press on behalf of Hannah Dairy Research Foundation



environment, a result of its polymorphic nature (77.7% magnesium calcite, 3.8% calcite, 16.6% aragonite, 2% silica), prolonging its neutralizing action in the ruminal pH due to the varying solubility of the constituents. Aragonite is more soluble than calcite, which is more soluble than magnesium calcite.

Previous studies with dairy cows demonstrated that supplementation with *Lithothamnium calcareum* increased DMI and milk fat yield (Neville *et al.*, 2022) and improved feed efficiency (Bernard *et al.*, 2014), hormone regulation, pH and ruminal fermentation (Cruywagen *et al.*, 2015). Nonetheless, research using this buffer in dairy cow herds remains scarce. Particularly, its effects on feeding and overall behaviour as well as metabolic parameters have not been compared with those of sodium bicarbonate.

Thus, the present study aimed to measure the impact of *Lithothamnium calcareum* on rumen health, feeding and activity behaviour, milk yield and composition and metabolic status in Holstein dairy cows fed a diet containing 29.28% DM of starch in total mixed ration (TMR).

Materials and methods

Animal ethics

This study was approved by the Animal Ethics and Experimentation Committee of the Federal University of Pelotas, registered under number 13784-2021.

Animals handling and facilities

Thirty-six multiparous Holstein cows were divided into two groups of eighteen cows (Control, CON; *Lithothamnium calcareum*, LITHO) blocked according to the average milk yield (38.46 ± 2.16 vs. 39.06 ± 2.16 kg/d; $P > 0.05$), days in milk (74.61 ± 4.05 vs. 75.88 ± 4.05 d, $P > 0.05$) and parity (3.22 ± 0.18 vs. 3.00 ± 0.18 , $P > 0.05$) at the beginning of the experiment. The cows were kept in a commercial dairy property in the city of Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brazil at geographic coordinates $32^{\circ}16'S$, $52^{\circ}32'E$ and maintained in an intensive compost barn system bedded with wood shaving and rice husk, with individual access to automated feeders and freshwater.

Experimental design and treatments

All animals were concomitantly treated over a 60 d period. Both treatments received the same basal diet as a TMR, which was formulated to be potentially acidotic (online Supplementary Table S1) and contain 29.28% starch. The diet was calculated to guarantee 24 kg/d dry matter intake (DMI), provided in two meals, each one with 50% of the total diet at 9 am and 6 pm, allowing for approximately 5% of refusals. A 0.5% dry matter (DM) level of the product (LithoNutri, Oceana, Jundiá, Brazil) was included in the diet for the LITHO group to ensure 102 g/ cow/day. The CON group received 1.1% of the diet DM of sodium bicarbonate to provide a daily intake of 280 g/cow/day (Raudi, Totalmix, São Carlos do Ivaí, Brazil).

The buffer doses were divided so that the animals received 50% of the total dose added on top of the diet during each feeding.

DMI, feeding behaviour and animal behaviour

DMI and feeding behaviour data were obtained daily (24 h/d) through individual automatic feeders, (Intergado, Minas Gerais,

Brazil). The parameters recorded were feed intake, eating time (min/day), eating frequency, number of visits to intake troughs, eating rate, kg of DM/min, meal size (kg/meal) and eating duration (min/meal). The latter was calculated by the eating time divided by the number of meals. The eating rate was calculated by dividing the amount of individual intake by the eating time.

Individual animal behaviour was monitored daily using monitoring collars (ChipInside, Santa Maria, Brazil) that indicated the time of activity, rumination, and idleness.

Milk production and composition

The cows were milked three times a day at 8 am, 4 pm and 11 pm. Daily milk yield was recorded individually during each milking period using the electronic milking system (DeLaval, Botkyrka, Sweden). Milk samples were collected on d 0, before the supplementation period, and on d 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56 and 60 of the experiment at each of the three milkings using bottles containing Bronopol preservative (2-bromine-2-nitropropane-1,3-diol and natamycin). Samples were kept refrigerated and sent to the milk analysis laboratory (PARLEITE, Curitiba, Paraná, Brazil) for analysis of fat, protein, lactose and total solids.

Milk yield was corrected for 4% fat (FCM4%) and for energy (ECM) using the following formulae:

$$\text{FCM4\%} = (0.4 \times \text{milk yield kg}) + (15 \times \text{fat production kg})$$

$$\text{ECM} = (0.3273 \times \text{milk yield kg}) + (7.65 \times \text{milk protein kg}) + (12.97 \times \text{milk fat kg})$$

The feed efficiency (FE) for milk yield was obtained using the following formulas:

$$(\text{FE}) = \text{Milk yield (kg/day)} / \text{DMI (kg)}$$

$$(\text{FE}) = \text{FCM4\% (kg)} / \text{DMI (kg)}$$

$$(\text{FE}) = \text{ECM (kg)} / \text{DMI (kg)}$$

pH and VFA ruminal fluid

On the same milk collection days, ruminal fluid was collected via ruminocentesis in three animals per treatment 4 h after the morning feeding. The ruminal pH was measured immediately after collection with a benchtop pH meter. An aliquot of ruminal fluid was stored at -80°C and subsequently used to determine the concentration of VFA. These were quantified using the nuclear magnetic resonance hydrogen technique tested by Wang *et al.* (2021).

Blood collection and analysis

Blood samples were collected from all cows on d 0, before the supplementation with buffer, and on d 21, 42 and 60 in three tubes: one containing sodium fluoride to obtain plasma and evaluate glucose concentrations, a second tube with silica for serum collection for analyses of urea, albumin, total plasma protein (PPT), paraoxonase 1 (PON1), non-esterified fatty acids (NEFA), and beta-hydroxybutyrate (BHB) and a third tube containing sodium heparin for analyses of pH, bicarbonate (HCO_3^-), carbon dioxide pressure (pCO_2), and blood oxygen pressure (pO_2). After collection, the samples were centrifuged at 2000 g for 15 min at room temperature and serum or plasma were saved into microtubes and then stored at -80°C for posterior analyses.

The evaluation of protein metabolism (albumin, PPT and urea) was determined using a colorimetric kit (Labtest, Belo Horizonte, Brazil). For energy metabolism, glucose (Labtest, Belo Horizonte, Brazil), NEFA and BHB (Diasys, Germany)

concentrations were analysed through colorimetric assay using commercial kits. The protein and energy profiles of the samples were determined using the automatic biochemical analyser (Labmax pleno, Labtest, MG, Brazil). PON1 analysis was performed using a spectrophotometer (Femto, 700 Plus). These parameters were evaluated in the metabolism laboratory of NUPEEC/UFPEL. pH, HCO_3^- and blood gas (pCO_2 , pO_2) were evaluated using a haemogasometry (i-STAT) device immediately after collection, as recommended by the manufacturer.

Faecal pH and starch levels

To assess faecal pH and starch levels, faeces samples were collected from all animals on d 0, before the supplementation with buffer, and on d 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56 and 60 of the experiment. Faecal pH was evaluated immediately, and samples were stored at -80°C for starch analyses. The starch concentration was assessed using a EsalqLAB/USP Laboratory and the AACC Method 76-13.01, AOAC Method 996.11, ICC Standard Method No. 168, and RACI Standard Method from the Total Starch Kit (Catalogue Number: AA/AMG – Megazyme International Ireland).

Feed samples

Diet samples were collected twice a week for DM evaluation using the air fryer method (Nogueira *et al.*, 2021). TMR samples were frozen for subsequent chemical analyses. Samples were analysed for concentrations of ash according to AOAC (1995). The crude protein analysis was performed based on the Kjeldahl methodology (AOAC, 1995). The neutral detergent fibre (NDF) analysis and ash-corrected acid detergent fibre (ADF) were determined according to Van Soest and Robertson (1985).

Statistical analysis

The results were analysed using the JMP Pro 14 program (SAS Institute Inc., 2018) by PROC MIXED, considering treatment, time and interaction as fixed effects and cow as random effects. DMI, feeding behaviour, animal behaviour, milk production and composition, pH and volatile fatty acids in ruminal fluid, faecal pH and starch levels as well as blood sample data were analysed as repeated measures using the MIXED procedure (JMP Pro 14, SAS). Statistical significance was considered at $P < 0.05$. P -values are presented as Tukey adjusted values. The best covariance structure was defined by the Akaike information criterion (AIC). Data were analysed according to the following statistical model:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + A_j + P_k + TP_{ik} + \epsilon_{ijk},$$

where Y_{ijk} represents the continuous variable; μ represents the general average; T_i is the fixed effect of the treatment ($i = \text{CON} \times \text{LITHO}$); A_j is the random effect of the animal ($j = 1$ to 36); P_k is the fixed effect of time ($k = 1$ to 60); TP_{ik} is the fixed effect of the interaction between treatment i and time k , and ϵ_{ijk} is the random error associated with each observation.

Results

Feeding and animal behaviour

The results of DMI, eating time and eating rate are presented in Table 1. There was no difference in DMI between the treatments ($P > 0.05$) suggesting that the different ruminal buffer did not affect the diet's palatability. The CON and LITHO cows consumed respectively 27.19 ± 0.54 and 26.73 ± 0.53 kg DM (mean $\pm$ SEM). However, the eating rate was significantly higher for CON than LITHO (0.24 ± 0.01 vs. 0.20 ± 0.01 kgDM/min, $P < 0.01$) whereas

Table 1. Intake, eating time, eating rate, milk yield and composition of Holstein cows fed diets supplemented with sodium bicarbonate (CON) or Lithothamnium calcareum (LITHO)

Parameters	LSMEANS $\pm$ SE			P-value	
	CON	LITHO	Treatment	Period	T $\times$ P
DMI (kg/day)	27.19 ± 0.54	26.73 ± 0.53	0.49	<0.01	0.14
Eating time (min/day)	121.76 ± 5.07^b	137.34 ± 4.94^a	0.01	<0.01	<0.01
Eating rate (kgDM/min)	0.24 ± 0.01^a	0.20 ± 0.01^b	<0.01	<0.01	<0.01
Milk yield (kg/day)	38.59 ± 0.71	39.06 ± 0.69	0.56	<0.01	0.37
FCM (kg)	37.78 ± 0.82^b	40.11 ± 0.82^a	0.01	<0.01	0.97
ECM (kg)	41.01 ± 0.85^b	43.25 ± 0.85^a	<0.01	<0.01	0.81
Efficiency – FCM/DMI	1.48 ± 0.03^b	1.59 ± 1.3^a	<0.01	<0.01	0.23
Efficiency – ECM/DMI	1.62 ± 0.03^b	1.71 ± 0.03^a	<0.01	<0.01	0.28
Fat, kg	1.46 ± 0.03^b	1.63 ± 0.03^a	<0.01	<0.01	0.99
Protein, kg	1.19 ± 0.02	1.23 ± 0.02	0.50	<0.01	0.24
Fat, %	3.80 ± 0.08^b	4.17 ± 0.08^a	0.01	0.02	0.65
Protein, %	3.10 ± 0.04	3.14 ± 0.04	0.50	<0.01	0.10
Total Solids, %	12.27 ± 0.13^b	12.67 ± 0.12^a	0.03	0.05	0.95
Lactose, %	4.43 ± 0.04	4.42 ± 0.04	0.92	0.46	0.99

T $\times$ P, Treatment interaction with period; DMI, dry matter intake; FCM, fat-corrected milk; ECM, energy-corrected milk. Different superscripts ^{a,b} denote significant differences ($P < 0.05$) within a row for the variables/parameter.

the reverse was true for eating time (121.76 ± 5.07 vs. 137.34 ± 4.94 min/d). This indicates that the animals in the LITHO group consumed feed at a slower rate but for a longer period.

Other results of feeding behaviour and of animal behaviour are described in online Supplementary Table S2. There were no differences between the groups in frequency of access to feeders, daily number of meals, meal size (kg/meal) and eating duration (min/meal). However, an interaction was noted between TRT $\times$ Period in frequency of access to feeders ($P = 0.02$) and number of meals ($P = 0.01$) for the animals in the LITHO group, as well as meal size ($P = 0.01$) and eating duration for cows in the CON group. Treatment did not affect the time of rumination, activity or idleness.

Production, composition and feed efficiency for milk yield

The effects of treatments, milk yield, milk composition and feed efficiency for milk yield are presented in Table 1. No differences were observed between LITHO and CON treatments for milk yield. However, LITHO exhibited greater ($P \leq 0.01$) yield of 4% FCM and ECM ($+2.3$ and 2.2 kg/d, respectively) than CON. Milk fat yield and concentration ($P \leq 0.01$) as well as per cent total solids ($P = 0.03$) were also higher for LITHO than for CON. No differences were observed in the yield or percentage of either protein or lactose in the milk.

The feed efficiency (milk/DMI) was not different between treatments ($P > 0.05$). However, the efficiency of FCM and ECM production was greater ($P < 0.01$) for LITHO than for CON.

Metabolic parameters and acid–base blood balance

The results of metabolic parameters are presented in online Supplementary Table S3. Treatment did not affect the glucose or BHB concentrations. Values for NEFA and PON concentrations were numerically (non-significantly) lower in the LITHO group compared with the values in the CON group. There was no difference in albumin, PPT, urea, Ca and Mg levels between treatments ($P > 0.05$). The results of acid–base blood balance presented in online Supplementary Table S4, showed no difference in blood pH, HCO_3^- , pCO_2 , or pO_2 between the groups.

Faecal starch and pH

The results of faecal pH and starch are shown Table 2. Faecal starch concentrations were not different among treatments, whereas faecal pH was higher ($P = 0.02$) for LITHO (6.18 ± 0.02) than for CON (6.11 ± 0.02).

Ruminal pH and VFA

Ruminal pH and VFA results are presented in Table 3. The treatments had no significant impact on ruminal pH values 4 h after

the morning feeding. In addition, the total proportions of acetate, propionate and butyrate were not different between treatments.

Discussion

Monitoring feeding behaviour is an important tool for dairy production systems, providing important information regarding the DMI and possible changes in animal health. Additionally, it can be very helpful for predicting disease, especially when monitoring animal behaviour using collars (Beauchemin, 2018; Cecim, 2018). According to González *et al.* (2012), feeding behaviour associated with a lower ruminal pH due to high dietary starch concentrations is characterized by a greater feeding rate, less frequent meals due to increased acid production, lower feed insalivation as well as shorter chewing and rumination time.

In the present study, the lack of difference in DMI between groups is consistent with results of Rauch *et al.* (2012) and Neville *et al.* (2019), in which the effect of supplementation with sodium bicarbonate and *Lithothamnium calcareum* did not affect the DMI of dairy cows. Bernard *et al.* (2014) showed that sodium bicarbonate increased the DMI in the last weeks of the study compared to that obtained using *Lithothamnium calcareum* in cows at the beginning of lactation. According to Russell and Chow (1993) and Perez-Ruchel *et al.* (2014), the increase in DMI with supplemental sodium bicarbonate is related to increased ruminal osmotic pressure which increases the water intake and passage rate. However, in our work feeding time was greater in the LITHO group, and the consumption rate was higher for the CON group. Despite this latter difference, rumination times were within physiological parameters (Beauchemin, 2018; Cecim, 2018) and not different between treatments. The mean rumination time of LITHO and CON were 601.67 ± 5.02 and 593.93 ± 4.81 min/d, respectively.

These results show that animals that received diets rich in starch, which generally decrease rumination time, responded positively to supplementation with buffers (DeVries *et al.*, 2009; Beauchemin, 2018). The lower consumption rate and longer feeding time of our LITHO cows was beneficial for the digestibility of the diet, as can be demonstrated by the intestinal buffering, represented by the higher pH of the faeces in these animals. There was no difference in faecal starch concentrations between treatments. Starch escaping digestion is excreted in the faeces and may result in performance impairment and economic losses. For both treatments, values were within the normal range of faecal starch concentration ($< 3\%$, Neiderfer *et al.*, 2020).

According to Erdman (1988), calcium carbonate, magnesium oxide and limestone have low rumen solubility and can pass to the lower tract and modify intestinal fermentation resulting in increased intestinal and faecal pH. Our results are consistent with those of Neiderfer *et al.* (2020), who also reported no difference in faecal starch. Nevertheless, faecal pH was higher for cows

Table 2. Faecal pH and starch concentrations of Holstein cows fed diets supplemented with sodium bicarbonate (CON) or Lithothamnium calcareum (LITHO)

Parameters	LSMEANS $\pm$ SE		P-value		
	CON	LITHO	Treatment	Period	T $\times$ P
Faecal pH	6.11 ± 0.02^b	6.18 ± 0.02^a	0.02	0.21	0.66
Faecal starch %	2.98 ± 0.38	2.79 ± 0.39	0.71	0.05	0.61

T $\times$ P, Treatment interaction with period.

Different superscripts ^{ab} denote significant differences ($P < 0.05$) within a row for the variables/parameter

Table 3. Ruminal pH and molar proportions (mol/100 mol) of individual volatile fatty acids 4 h after the morning feeding from Holstein cows fed diets supplemented with sodium bicarbonate (CON) or *Lithothamnium calcareum* (LITHO)

Parameters	LSMEANS $\pm$ SE		P-value		
	CON	LITHO	Treatment	Period	T $\times$ P
Ruminal pH	6.80 $\pm$ 0.11	6.70 $\pm$ 0.11	0.57	0.48	0.56
Acetic acid	62.60 $\pm$ 1.21	62.13 $\pm$ 1.33	0.56	0.26	0.44
Propionic acid	22.98 $\pm$ 1.13	23.71 $\pm$ 1.19	0.67	0.43	0.27
Butyric acid	14.42 $\pm$ 0.59	14.16 $\pm$ 0.74	0.59	0.81	0.99

T $\times$ P, Treatment interaction and period.

that received LITHO. Wheeler and Noller (1977) reported increased pH of the lower gastrointestinal tract and faeces using limestone supplementation. Clark *et al.* (1989) showed that the increase in faecal pH observed with calcium carbonate supplementation is accompanied by a decrease in faecal starch. This inverse correlation can be explained by improved buffering of the small intestine, increasing the efficiency of enzymatic starch digestion (Neiderfer *et al.*, 2020). In the current experiment, faecal starch remained within acceptable levels. It was not affected by treatment, although differences in intestinal acid neutralization were evidenced by increased faecal pH in LITHO animals. However, the low number of faeces samples analysed for starch may have limited our ability to observe this correlation.

Milk yield was similar between treatments. However, the yield of FCM and ECM was higher in the LITHO group compared with the CON group, which may be due to greater VFA production, as suggested by studies conducted by Cruywagen *et al.* (2015) and Neville *et al.* (2022), who attributed the greater milk production and parameters (4% FCM and ECM) in cows supplemented with *Lithothamnium calcareum* to an increase in VFAs.

The treatment also had a significant effect on feed utilization efficiency for milk production. Considering FCM/DMI and ECM/DMI, efficiency was higher in the LITHO than in the CON group. This improvement can be attributed to an improvement in milk components. Cruywagen *et al.* (2015) and Bernard *et al.* (2014) reported an improved efficiency of 4% FCM/DMI and ECM/DMI, respectively, for cows fed with *Lithothamnium calcareum* compared to cows fed sodium bicarbonate, and our results are consistent with these data.

All metabolic parameters were within the physiological reference range for bovine species (Beigh *et al.*, 2018; Quiroz-Rocha *et al.*, 2009). Serum concentrations of NEFA are used as indicators of body fat mobilization and poor metabolic status. *Lithothamnium calcareum* supplementation did not affect the serum glucose and BHB levels in this study. However, serum NEFA showed a numerical (non-significant) decrease in the LITHO group compared to that in the CON group, indicating an improvement in energy utilization.

Serum protein and mineral (Ca and Mg) concentrations were similar in both groups, which is consistent with the results of Wu *et al.* (2015) and Neville *et al.* (2022). An increase in Ca and Mg concentrations in the LITHO group could be expected due to the increased bioavailability of this supplement. However, Cruywagen *et al.* (2015) demonstrated that *Lithothamnium calcareum* is sparingly soluble in water due to its chemical and physical properties, releasing cations slowly and thereby maintaining the buffer effect for longer in the ruminal environment. Due to this slower release,

there was no change in the absorption rate, keeping these minerals at physiological rates in the blood.

The blood acid–base balance was not affected by the treatments. Blood pH is mainly regulated by the respiratory system, which efficiently provides sufficient CO₂ to stabilize the pH. An increased CO₂ concentration causes increased H⁺ ions and acidity in the bloodstream. Conversely, a decrease in CO₂ levels causes blood alkalinity (Carlson, 1997; Kozloski, 2011). Only a few studies have evaluated the effects of seaweed on blood characteristics. Wheeler *et al.* (1981) reported no difference in blood pH or HCO₃[−] when assessing the effect of calcium and sodium bicarbonate levels in high-concentrate diets for beef cattle. Bigner *et al.* (1997) found that sodium bicarbonate and sodium propionate effectively increased the concentration of HCO₃[−] and maintained the blood pH at 7.4 in acidotic dairy cows. Carvalho *et al.* (2016) observed an increase in blood pH of cows supplemented with *Lithothamnium calcareum* compared to that of control cows. Our values for blood pH, HCO₃[−] and pO₂ were slightly above the normal range in both groups. pO₂ is linked to blood pH, which means as pH increases, the pressure also increases. Conversely, pCO₂ decreases as the blood pH increases (Carlson, 1997; Kozloski, 2011), which did not occur in the present study. However, based on the blood and ruminal characteristics we observed, there was no ruminal and metabolic acidosis in the animals in both groups.

Our results show that the two treatments with buffers did not alter ruminal pH and were effective in maintaining the ruminal health. VFA production was also not altered, which possibly contributed to the unaltered glucose concentration. These results are consistent with the study by Neville *et al.* (2019), in which cows supplemented with seaweed (*Lithothamnium calcareum*) maintained an average ruminal pH (over 24 h) similar to that obtained with sodium bicarbonate.

A difference could be expected in variations in ruminal pH and VFA production over time, contributing to improvements in ruminal fermentation and digestibility. The difference observed in the milk constituents in the LITHO group may have resulted from this, since because it is more stable and has a slower release of its constituents (calcite, vaterite, aragonite and dolomite) in the rumen, *Lithothamnium calcareum* buffers effectively for a longer period of time than sodium bicarbonate (Carvalho *et al.*, 2016). In conclusion, supplementation with *Lithothamnium calcareum* algae provides an effective alternative to sodium bicarbonate as a means of preventing rumen acidosis in lactating dairy cows fed a high starch diet. The results also showed greater feed efficiency when assessed relative to fat- or energy-corrected

production.

Supplementary material. The supplementary material for this article can be found at <https://doi.org/10.1017/S0022029925000081>

Acknowledgements. The authors thank the Federal University of Pelotas (UFPEL), Nucleus of Research, Teaching and Extension in Livestock (NUPEEC), the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), the Research Support Foundation of the State of Rio Grande do Sul (FAPERGS), and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for funding this project as well as awarding scholarships.

References

- AOAC International (1995) *Official Methods of Analysis*, 16th Edn. AOAC International Washington DC, USA.
- Bach A, Guasch I, Elcoso G, Duclos J and Khelil AH (2018) Modulation of rumen pH by sodium bicarbonate and blend of different sources of magnesium oxide in lactation dairy cows submitted to a concentrate challenge. *Journal of Dairy Science* 101, 9777–9788.
- Beauchemin KA (2018) Invited review: current perspectives on eating and rumination activity in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 101, 4762–4784.
- Beigh UA, Ahmad H, Ganai AM and Masood D (2018) Blood metabolic profile of lambs fed complete diet supplemented with exogenous fibrolytic enzymes cocktail. *Journal Animal Health and Production* 6, 96–102.
- Bernard J, West JW, Mullis N, Wu Z and Raylor SJ (2014) Evaluation of calcareous marine algae supplements on production and metabolic parameters of early lactation dairy cows. *Professional Animal Scientist* 30, 649–656.
- Bigner DR, Goff JP, Faust MA, Tyler HD and Horst RL (1997) Comparison of oral sodium compounds for the correction of acidosis. *Journal of Dairy Science* 80, 2162–2166.
- Carlson GP (1997) Fluid, electrolyte, and acid-base balance. In Kaneko JJ, Harvey JW and Bruss ML (eds.), *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Academic Press, pp. 485–516.
- Carvalho RF, Mazon MR, Silva APS, Oliveira IS, Zotti CA and Silva SL (2016) Use of calcareous algae and monensin in Nellore cattle subjected to an abrupt change in diet. *Ciência Rural* 46, 713–718.
- Cecim M (2018) Remote monitoring of cow health in transition. In: *V Dairy Cow Symposium, Porto Alegre. Anais Porto Alegre, ufrgs publishing house, Brasil*, pp. 86–113.
- Chalupa W, Galligan DT and Ferguson JD (1996) Animal nutrition and management in the 21st century: dairy cattle. *Animal Feed Science and Technology* 58, 1–18.
- Clark JH, Plegue AH, Davis CL and McCoy GC (1989) Effects of calcium carbonate on ruminal fermentation, nutrient digestibility, and cow performance. *Journal of Dairy Science* 72, 493–500.
- Cruywagen CW, Taylor S, Beya MM and Calitz T (2015) The effect of buffering dairy cow diets with limestone, calcareous marine algae, or sodium bicarbonate on ruminal pH profiles, production responses, and rumen fermentation. *Journal of Dairy Science* 98, 5506–5514.
- DeVries TJ, Beauchemin KA, Dohme F and Schwartzkopf GKS (2009) Repeated ruminal acidosis challenges in lactating dairy cows at high and low risk for developing acidosis: feeding, ruminating and lying behaviour. *Journal of Dairy Science* 92, 5067–5078.
- Erdman RA (1988) Dietary buffering requirements of the lactating dairy cow: a review. *Journal of Dairy Science* 71, 3246–3266.
- Golder HM, LeBlanc SJ, Duffield T, Rossow HA, Bogdanich R, Hernandez L and Lean IJ (2023) Characterizing ruminal acidosis risk: a multiherd, multicountry study. *Journal of Dairy Science* 106, 3155–3175.
- González FHD, Corrêa MN, Castelletto JLB and Silva SC (2012) *[Metabolic Disorders of Domestic Animals]*, 2nd Edn. Pelotas: Publisher and University Graphic UFPEL, p. 469.
- Guerreiro P, Meschiatti MA, de Souza Monteiro L, Gouvêa V and Santos F (2019) Effect of monensin, a blend of essential oils and *Lithothamnium calcareum* over two racial groups in finishing cattle diets. *Journal of Animal Science* 97, 444.
- JMP®. (2018) Version Pro 14, SAS Institute INC., Cary, NC, USA.
- Kozloski GV (2011) *[Biochemistry of Ruminants]*, 3rd Edn. Brasil: Santa Maria: UFSM, pp. 1–216.
- Martins CMMR, Fonseca DCM, Alves BG, Rennó FP and Santos MV (2021) Effect of dietary no fiber carbohydrate source and inclusion of buffering on lactation performance, feeding behaviour and milk stability of dairy cows. *Animal Feed Science and Technology* 278, 1–10.
- Mawda E, Darien KA, Mawahib KK and Hongrong W (2022) Subacute ruminal acidosis in dairy herds: microbiological and nutritional causes, consequences, and prevention strategies. *Animal Nutrition* 10, 148–155.
- Mu Y, Qi W, Zhang T, Zhang J and Mao S (2023) Coordinated response of milk bacterial and metabolic profiles to subacute ruminal acidosis in lactating dairy cows. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 14, 60.
- Neiderfer KP, Barnard AM, Moyer KZ, Trench AM, Taylor AE, Cronin SK and Gressley TF (2020) Effects of calcium carbonate, magnesium oxide and encapsulated sodium bicarbonate on measures of post-ruminal fermentation. *Animal Physiology and Animal Nutrition* 104, 802–811.
- Neville EW, Fahey AG, Gath VP, Molloy BP, Taylor SJ and Mulligan FJ (2019) The effect of calcareous marine algae, with or without marine magnesium oxide, and sodium bicarbonate on rumen pH and milk yield in mid lactation dairy cows. *Journal of Dairy Science* 102, 8027–8039.
- Neville EW, Faheyf AG, Meade KG and Mulligan FJ (2022) Effects of calcareous marine algae on milk yield, feed intake, energy balance, mineral status, and inflammatory markers in transition dairy cows. *Journal of Dairy Science* 105, 6616–6627.
- Nogueira RB, Marinho RC, Oliveira EC, Silva AE, Souza RC and Menezes GL (2021) [A new equation for predicting dry matter content in corn silage using air fryer]. *Sinapse Múltipla* 10, 371–372.
- Perez-Ruchel A, Repetto J and Cajarville C (2014) Use of NaHCO₃ and MgO as additives for sheep fed only pasture for a restricted period of time per day: effects on intake, digestion and the rumen environment. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 98, 1068–1074.
- Quiroz-Rocha GF, LeBlanc SJ, Duffield TF, Wood D, Leslie KE and Jacobs RM (2009) Reference limits for biochemical and hematological analytes of dairy cows one week before and one week after parturition. *Canadian Veterinary Journal* 50, 383–388.
- Rauch RE, Robinson PH and Erasmus LJ (2012) Effects of sodium bicarbonate and calcium magnesium carbonate supplementation on performance of high producing dairy cows. *Animal Feed Science Technology* 177, 180–193.
- Russell JB and Chow JM (1993) Another theory for the action of ruminal buffer salts: decreased starch fermentation and propionate production. *Journal of Dairy Science* 76, 826–830.
- Srivastava R, Singh P, Tiwari S, Mishra DB and Kumar G (2021) Subacute ruminal acidosis: understanding the physiology and management with exogenous buffers. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 9, 593–599.
- Van Soest PJ (1994) *Nutritional Ecology of the Ruminant*, 2nd Edn. London, UK: Comstock Publishing Associates.
- Van Soest PJ and Robertson JB (1985) Analysis of forages and fibrous foods. *AS 613 Manual. A laboratory manual for animal science*. New York, USA: Department of Animal Science Cornell University Press, pp. 1–165.
- Wang M, Wang H, Zheng H, Uhrin D, Dewhurst R and Roehe R (2021) Comparison of HPLC and NMR for quantification of the main volatile fatty acids in rumen digesta. *Scientific Reports* 11, 1–15.
- Wheeler WE and Noller CH (1977) Gastrointestinal tract pH and starch in feces of ruminants. *Journal of Dairy Science* 44, 131–135.
- Wheeler WE, Noller CH and Branco JL (1981) Effect of level of calcium and sodium bicarbonate in high concentrate diets on performance and nutrient utilization by beef steers. *Journal of Dairy Science* 53, 499–515.
- Wu Z, Bernard JK and Taylor SJ (2015) Effect of feeding calcareous marine algae to Holstein cows prepartum or postpartum on serum metabolites and performance. *Journal of Dairy Science* 98, 4629–4639.

Comparison of marine algae-based rumen buffer with sodium bicarbonate buffer and its role in increasing milk value

Magna F.B. Savela, Laura V. Vieira, Jaqueline G. Fischer, Eliza R. Komninou, Francisco A.B. Del Pino, Cássio C. Brauner, Antônio A. Barbosa, Alysson P. Silveira, Graziela S. Boer and Marcio N. Corrêa

SUPPLEMENTARY FILE

Supplementary Table S1. Ingredients and chemical composition of basal TMR and concentrate of the experimental diets

Item	Treatments ¹	
	CON	LITHO
Inclusion proportion	g/kg/DM	
Roughage	460	460
Concentrate	540	540
Ingredient of the TMR	g/kg/DM	
Water	0.1	0.1
Corn Silage	318.6	318.6
Pre-dried ryegrass	438.6	438.6
Concentrate	896.7	896.7
Sodium bicarbonate	280	-
<i>Lithothamnium calcareum</i>	-	102
Ingredient of the Concentrate	g/kg/DM	
Wholegrain rice bran	126.5	126.5
Milled grain corn	387.5	387.5
Soy hull	169.8	169.8
Soybean meal	228.3	228.3
Bypass protein	50.9	50.9
Livestock Urea	8.2	8.2
Protected Fat	14.0	14.0
Mineral Premix	3.9	3.9
Common salt	10.9	10.9
TMR chemical analysis		
DM (g/kg/DM)	464.7	464.7
Mineral Matter (g/kg/DM)	72.6	72.6
Crude Protein (g/kg/DM)	167.6	167.6
Ether extract (g/kg/DM)	45.6	45.6
NDF (g/kg/DM)	326.2	326.2
ADF (g/kg/DM)	198.7	198.7
Starch (g/kg/DM)	292.8	292.8
NFC (g/kg/DM)	388.0	388.0
DCAD meq/100gr	283.7	283.7

DM = dry matter. TMR = totally mixed ration. NDF = neutral detergent fibre. ADF = acid detergent fibre. NFC = Non fibrous carbohydrates.

Supplementary Table S2. Feeding behavior and activity of Holstein cows fed diets supplemented with sodium bicarbonate (CON) or *Lithothamnium calcareum* (LITHO)

Parameters	LSMEANS±SE		P-value		
	CON	LITHO	Treatment	Period	TxP
Freq ³ . access troughs/day	66.88±4.10	69.20±3.98	0.65	<0.01	0.02
Number of meals (N ^o /day)	33.18±2.14	33.85±2.07	0.78	<0.01	0.01
Meal size (kg/meal)	1.15±0.05	1.14±0.05	0.99	<0.01	0.01
Eating duration (min/meal)	5.77±0.35	5.75±0.35	0.95	<0.01	<0.01
Rumination (min/day)	593.93±4.81	601.67±5.02	0.27	<0.01	0.15
Activity (min/day)	230.19±8.89	215.29±9.15	0.25	<0.01	0.70
Idle (min/day)	605.28±9.79	615.82±9.48	0.44	<0.01	0.78

^{ab}Within a line, different superscript lowercase letters denote significant differences (P<0.05) among the samples.

LSMEANS ± standard error of the mean (SE).

TxP = Treatment interaction with period.

Freq = frequency.

Supplementary Table S3. Blood metabolite and mineral concentrations of Holstein cows fed diets supplemented with sodium bicarbonate (CON) or *Lithothamnium calcareum* (LITHO)

Parameters	LSMEANS±SE		P-value		
	CON	LITHO	Treatment	Period	TxP
Total Protein (g/dL)	8.09 ± 0.09	7.87 ± 0.09	0.10	0.05	0.43
Albumin (g/dL)	2.77 ± 0.03	2.73 ± 0.03	0.20	0.09	0.60
Urea (mg/dL)	28.39± 1.60	28.80 ± 1.59	0.84	<0.01	0.12
Glucose (mg/dL)	59.96 ± 0.76	61.09 ± 0.76	0.29	<0.01	0.44
Calcium (mg/dL)	8.58 ± 0.10	8.52 ± 0.10	0.57	0.19	0.99
Magnesium (mg/dL)	2.24 ± 0.05	2.26 ± 0.05	0.83	0.75	0.22
NEFA (mmol/L)	0.43 ± 0.03	0.35 ± 0.03	0.07	<0.01	0.76
βHBA (mmol/L)	0.47 ± 0.02	0.48 ± 0.02	0.92	0.86	0.13
PON (U/mL)	129.08±4.58	117.56±4.55	0.09	0.07	0.78

58 TxP = Treatment interaction with period. NEFA = Non-esterified fatty acids. BHBA = Beta-hydroxybutyrate. PON = Paraoxonase.

Supplementary Table S4. Blood acid base balance of Holstein cows fed diets supplemented with sodium bicarbonate (CON) or *Lithothamnium calcareum* (LITHO)

Parameters	LSMEANS±SE		P-value		
	CON	LITHO	Treatment	Period	TxP
Blood pH	7.46 ± 0.02	7.45 ± 0.02	0.85	0.23	0.21
HCO ₃ ³	31.91± 1.08	30.66 ± 1.06	0.46	0.61	0.56
pCO ₂ ⁴	45.02 ± 1.63	44.91 ± 1.64	0.96	0.08	0.87
pO ₂ ⁵	72.77± 8.03	72.52 ± 7.81	0.98	0.47	0.50

TxP = Treatment interaction with period. HCO₃ = Bicarbonate. pCO₂ = Partial carbon dioxide pressure. pO₂ = Partial oxygen pressure.

4.2 Manuscrito 2

- short communication-

Produção de metano entérico estimado a partir dos ácidos graxos voláteis do fluido ruminal de vacas leiteiras suplementadas com *Lithothamnium Calcareum*

Magna Fabrícia Brasil Savelle, Uriel Secco Londero, Laura Valadão Vieira, Francisco Augusto Burkert Del Pino, Marcio Nunes Corrêa

Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil. *Autor para correspondência: fabibrasil93@gmail.com

short communication publicado no periódico: Revista de Ciências Agroveterinárias

Produção de metano entérico estimado a partir dos ácidos graxos voláteis do fluido ruminal de vacas leiteiras suplementadas com *Lithothamnium Calcareum*

Estimated enteric methane production from volatile fatty acids in the ruminal fluid of dairy cows supplemented with Lithothamnium Calcareum

Magna Fabrícia Brasil Savela *(ORCID 0000-0003-0886-2054), **Uriel Secco Londero** (ORCID 0000-0001-5595-1223), **Laura Valadão Vieira** (ORCID 0000-0003-4079-8128), **Francisco Augusto Burkert Del Pino** (ORCID 0000-0002-5142-5215), **Marcio Nunes Corrêa** (ORCID 0000-0003-0855-2750)

Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil. *Autor para correspondência: fabibrasil93@gmail.com

Submissão: 10/01/2024 | Aceite: 01/09/2024

RESUMO

O objetivo do estudo foi estimar a produção de metano (CH₄) a partir das proporções de ácidos graxos voláteis (AGV) no fluido ruminal e determinar a sua relação com o consumo de matéria seca (CMS) em vacas leiteiras suplementadas com *Lithothamnium calcareum*. Seis vacas lactantes multíparas da raça Holandesa, foram distribuídas em dois grupos experimentais, grupo controle (CON; n=3) suplementada com 1,1% de MS de bicarbonato de sódio; e grupo *Lithothamnium calcareum* (LITHO; n=3), com 0,5% da MS de *Lithothamnium calcareum*. Coletas de líquido ruminal foram realizadas uma vez por semana para avaliação de pH e AGV. Diariamente foram registrados o CMS dos animais. A produção de CH₄ foi estimada através de equações baseadas nas proporções de AGV ruminais. Não houve diferença entre o CMS (kg/dia), concentrações de AGV e relação acetato/propionato entre os grupos ($P>0,05$). O rendimento de metano (g CH₄/kg CMS) não teve diferença ($P>0,05$) entre os grupos nos modelos de equação testados. Não houve uma correlação satisfatória entre o CMS e o rendimento de CH₄ para animais do o grupo LITHO e CON. *Lithothamnium calcareum* como aditivo alimentar não foi capaz de reduzir a produção de CH₄, estimada a partir equações baseadas nas proporções de AGV ruminais.

PALAVRAS-CHAVE: Gás de efeito estufa; mitigação de metano; algas marinhas; ruminantes.

ABSTRACT

The aim of this study was to estimate methane (CH₄) production from the proportions of volatile fatty acids (VFA) in ruminal fluid and to determine its relationship with dry matter intake (DMI) in dairy cows supplemented with *Lithothamnium calcareum*. Six multiparous lactating Holstein cows were divided into two experimental groups: control group (CON; n=3) supplemented with 1.1% DM of sodium bicarbonate; and *Lithothamnium calcareum* group (LITHO; n=3) supplemented with 0.5% DM of *Lithothamnium calcareum*. Ruminal fluid was collected once a week to evaluate pH and VFA. DMI of the animals was recorded daily. CH₄ production was estimated using equations based on ruminal VFA proportions. There was no difference in DMI (kg/day), VFA concentrations and acetate/propionate ratio between the groups ($P>0.05$). The methane yield (g CH₄/kg DMI) did not differ ($P>0.05$) between the groups in the equation models tested. There was no satisfactory correlation between DMI and CH₄ yield for animals in the LITHO and CON groups. *Lithothamnium calcareum* as a feed additive was not able to reduce CH₄ production, estimated from equations based on ruminal VFA proportions.

KEYWORDS: Greenhouse gas; methane mitigation; seaweed; ruminants.

A atividade pecuária tem entrado no foco das discussões ambientais nos últimos anos, devido ao desmatamento de áreas de floresta para implantação de pastagens, e por ser responsável direto pelas emissões de gases do efeito estufa (GEE), dióxido de carbono (CO₂) e metano (CH₄) (SIMANUNGKALIT et al. 2023). A maior contribuição do setor pecuário provém dos sistemas de produção de bovinos e ovinos que são responsáveis por até 18% do total das emissões globais dos GEE principalmente na forma de metano

entérico e da decomposição do esterco (KINLEY et al. 2020).

O metano entérico é um subproduto natural da fermentação de nutrientes no ambiente ruminal, sua produção, além de causar impactos ambientais também significa perda da eficiência energética da dieta, afetando diretamente a produtividade animal, representando até 11% da energia bruta dietética consumida pelos ruminantes (ROQUE et al. 2019).

A manipulação da dieta é considerada a estratégia mais direta e eficaz para reduzir as emissões de CH₄ dos sistemas de produção de ruminantes (MAIA et al. 2016). Entre elas, o uso de aditivos alimentares e a suplementação com alto teor de concentrado se apresentam eficazes na redução de CH₄ (EUGÉNE et al. 2011). Avanços recentes em aditivos alimentares com potencial para mitigar as emissões de metano entérico direta ou indiretamente inibindo as arqueas metanogênicas vem sendo pesquisados, entre elas, a suplementação com algas marinhas vermelhas vem tendo resultados satisfatórios devido aos seus compostos halogenados conhecidos por inibir a metanogênese dependente de cobamida (KINLEY et al. 2020). *Lithothamnium calcareum* é uma alga marinha vermelha muito utilizada na alimentação de ruminantes como tamponante do pH ruminal (NEVILLE et al. 2022). No entanto, nenhum estudo observando os efeitos de *Lithothamnium calcareum* como aditivo antimetanogênico foi realizado.

As emissões de CH₄ dos bovinos são difíceis de medir, dependem de equipamentos caros e pessoas qualificadas, sendo impraticável para uso rotineiro em larga escala em fazendas leiteiras (HAMMOND et al. 2015). Dessa forma, algumas alternativas têm sido usadas para prever a produção de CH₄, com o consumo de matéria seca (CMS), perfil de ácidos graxos do leite (CHARMLEY et al. 2016) e proporções de AGV no fluido ruminal (WILLIAMS et al. 2019). Equações modelos baseadas no CMS, composição da dieta, peso corporal, produção e composição do leite foram usados por NIU et al. (2018) para prever a produção de metano (g/dia) em vacas leiteiras, e WILLIAMS et al. (2019) apresentou equações para prever a produção de metano em vacas leiteiras a partir das proporções dos AGV no fluido ruminal incluindo acetato, propionato e butirato.

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi estimar a produção de metano de vacas leiteiras da raça Holandês suplementadas com *Lithothamnium calcareum* como um ingrediente alimentar antimetanogênico em comparação ao bicarbonato de sódio em uma dieta rica em amido, previsto a partir das proporções de AGV no fluido ruminal e determinar a relação da produção de CH₄ com o CMS.

Para realização desse estudo foram utilizadas seis vacas Holandesas múltiparas em lactação, com $63,74 \pm 18,63$ dias em lactação (DEL), pesando 694 ± 20 kg (SE), com paridade média de $3 \pm 0,59$ lactação, e média de produção de leite pré-experimental $38,83 \pm 9,29$ kg/dia foram usadas no estudo. As vacas foram mantidas em uma propriedade leiteira comercial na cidade de Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil, e mantidas em um galpão de sistema de *compost barn* com cama de maravalha e casca de arroz com acesso a comedouros automatizados e individuais e água a vontade. O protocolo de estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas, registrado sob o código 13784-2021.

As vacas foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos: Controle (CON) e *Lithothamnium calcareum* (LITHO), ambos compostos por três animais, durante um período experimental de 56 dias, sendo os grupos manejados conjuntamente durante o período experimental. Ambos os tratamentos receberam a mesma dieta basal como ração total misturada (TMR) com uma relação concentrado:volumoso de 54:46% e 29,28% de amido na TMR, as diferenças entre os grupos foram atribuídas à inclusão de 0,5% da MS da dieta de *Lithothamnium calcareum* para o grupo LITHO e para o grupo CON incluído 1,1% da MS da dieta de bicarbonato de sódio, conforme indicação do nutricionista da fazenda, que foram previamente misturados no cocho à TMR imediatamente antes da oferta.

Diariamente foram obtidos os dados de CMS por meio de comedouros automáticos e individuais. Para verificar a correlação entre o CMS com os demais parâmetros, foi realizada uma média semanal de CMS, na qual foram consideradas semanas aquelas que apresentassem no mínimo cinco dias de consumo registrados.

Amostras de líquido ruminal foram coletados por ruminocentese 4h após a alimentação matinal no dia 0, antes da suplementação com a alga e bicarbonato de sódio, e após administração nos dias 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 e 56 do experimento. O pH do líquido ruminal foi imediatamente medido usando um Phmetro de bancada. Amostras do fluido ruminal foram armazenadas a -80 °C e, posteriormente, utilizadas para determinar as concentrações de AGV (acetato, propionato e butirato total), sendo quantificada pela técnica de ressonância magnética nuclear de hidrogênio segundo WANG et al. (2021).

Para quantificar o rendimento de metano (RM, g CH₄/kg de CMS) foram utilizadas equações

validadas por WILLIAMS et al. (2019), utilizando dados independentes publicados de bovinos leiteiros e de corte consumindo uma ampla variedade de dietas, que podem ser usadas em pesquisas para estimar a produção de metano a partir de dados de AGV. As seguintes equações propostas por WILLIAMS et al. (2019) foram utilizadas:

$$RM = 4,08 \times (\text{acetato} / \text{propionato}) + 7,05 \quad \text{Equação 1}$$

$$RM = 3,28 \times (\text{acetato} + \text{butirato}) / \text{propionato} + 7,6 \quad \text{Equação 2}$$

$$RM = 316 / \text{propionato} + 4,4 \quad \text{Equação 3}$$

Onde a equação 1 é baseada em uma associação comumente observada entre produção de metano e a proporção (acetato/propionato). A equação 2 é baseada em uma associação comumente observada entre a produção de metano e (acetato + butirato)/propionato e a equação 3 é uma simplificação das equações 1 e 2 (WILLIAMS et al. 2019).

Os resultados foram analisados usando o programa JMP® Pro 14 (SAS Institute inc. 2018-2024) por meio do PROC MIXED, para CMS, AGV (acetato, propionato e butirato), ralação acetato/propionato e rendimento de CH₄, tendo como efeitos fixos o grupo, a coleta e suas interações e o animal como efeito aleatório. Os dados coletados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e quando o teste de “F” foi significativo, as médias de tratamento foram comparadas pelo teste de Tukey (P<0,05). As estruturas de covariância (Residual, Unequal Variances, Undstructured, AR(1), Antedependent Equal Variances, Antedependent) foram testadas e os componentes de variância foi a que apresentou o menor valor no critério de informação Bayesiano, sendo está utilizada para as análises de medidas repetidas. A correlação entre o rendimento de CH₄ e o CMS e as proporções de acetato, propionato e butirato e o CMS foram analisados no programa JMP® Pro 14, utilizando a Correlação de Pearson. Caso haja correlação satisfatória (acima de 0,84) e significativa (p< 0,05) será realizado a regressão linear simples.

A inclusão de *Lithothamnium calcareum* na TMR de vacas leiteiras neste estudo não teve efeito (P = 0,15) sobre CMS durante o período de tratamento. Também não teve diferença no CMS na média semanal (P = 0,31), pH ruminal (P=0,57), concentrações totais de acetato, propionato e butirato (P=0,88; P=0,65 e p=0,62, respectivamente), bem como, a relação A/P não foram significativamente diferentes entre as dietas LITHO e CON (2,64 e 2,59 respectivamente, P = 0,77), conforme descritos na Tabela 1.

Tabela 1. CMS, pH ruminal e AGV individual (acético, propiônico, butírico; mol/100 mol de AGV) de vacas holandesas alimentadas com dietas suplementadas com bicarbonato de sódio (CON) ou *Lithothamnium calcareum* (LITHO).

Table 1. DMI, ruminal pH and individual VFA (acetic, propionic, butyric; mol/100 mol VFA) of Holstein cows fed diets supplemented with sodium bicarbonate (CON) or *Lithothamnium calcareum* (LITHO).

Grupo ¹ média±EPM ²	Valor de P		
Parâmetros	CON	LITHO	Grupo
CMS/kg/dia	24,43±1,47	25,89 ± 1,47	0,15
CMS/kg/semana	25,63±0,68	26.61 ± 0.66	0,31
pH ruminal	6,79±0,11	6,71±0,11	0,57
Acetato	60,62±1,42	60,33±1,42	0,88
Propionato	24,11±0,74	23,62±0,74	0,65
Butirato	15,14±0,84	15,92±0,84	0,52
Acetato/Propionato (Mm)	2,59±0,12	2,64±0,12	0,77

¹Grupo: CON = Bicarbonato de sódio; LITHO = *Lithothamnium calcareum*. ² Média ± erro padrão da média (EPM).

O rendimento de metano (g CH₄/kg CMS) não teve diferença entre os grupos nos três modelos de equação testados (Eq. 1 (P = 0,77), Eq. 2 (P = 0,60), Eq. 3 (P = 0,61)), demonstrando um desempenho semelhante entre os grupos, conforme demonstrado na Tabela 2.

Os resultados da Tabela 3 demostram que o rendimento de CH₄ não teve uma correlação positiva satisfatória (acima de 0,84) com o CMS semanal em todos os modelos de equação testados (Eq.1: r 0,47), (Eq.2: r 0,49) e (Eq.3: r 0,49) para o grupo LITHO, embora o valor de P tenha sido significativo (P< 0,05), e não houve significância entre o rendimento de CH₄ e o CMS semanal no grupo CON. Também não houve uma correlação positiva satisfatória entre o CMS semanal com as proporções de acetato (r 0,40, p<0,05) e uma correlação negativa satisfatória com as proporções de propionato (r -0,47, p<0,05) no grupo LITHO (Tabela 4).

Tabela 2. Rendimento de CH₄ (RM) de vacas holandesas alimentadas com dietas suplementadas com bicarbonato de sódio (CON) ou *Lithothamnium calcareum* (LITHO).

Table 2. CH₄ yield of Holstein cows fed diets supplemented with sodium bicarbonate (CON) or *Lithothamnium calcareum* (LITHO).

Grupo ¹ médio±EPM ²	Valor de P		
Parâmetros	CON	LITHO	Grupo
CH ₄ 1 (g de CH ₄ /kg MS) ³	17,64±0,50	17,85±0,50	0,77
CH ₄ 2 (g de CH ₄ /kg MS) ⁴	18,19±0,40	18,49±0,40	0,60
CH ₄ 3 (g de CH ₄ /kg MS) ⁵	17,78±0,38	18,06±0,38	0,61

¹Grupo: CON = Bicarbonato de sódio; LITHO = *Lithothamnium calcareum*. ²Média ± erro padrão da média (EPM); ³RM = 4,08 × (acetato / propionato) + 7,05; ⁴RM = 3,28 × (acetato + butirato) / propionato + 7,6; ⁵RM = 316 / propionato + 4,4.

Tabela 3. Correlação entre o CMS semanal e o rendimento de CH₄ (RM) de vacas holandesas alimentadas com dietas suplementadas com bicarbonato de sódio (CON) ou *Lithothamnium calcareum* (LITHO).

Table 3. Correlation between weekly DMI and CH₄ yield of Holstein cows fed diets supplemented with sodium bicarbonate (CON) or *Lithothamnium calcareum* (LITHO).

Grupo CON ¹			
	Valor de r	Valor de R ²	Valor de P
CMS (semanal) x CH ₄ 1 ²	-0,11	0,01	0,58
CMS (semanal) x CH ₄ 2 ³	-0,12	0,01	0,53
CMS (semanal) x CH ₄ 3 ⁴	-0,12	0,01	0,55
Grupo LITHO ¹			
	Valor de r	Valor de R ²	Valor de P
CMS (semanal) x CH ₄ 1 ²	0,47	0,22	0,01
CMS (semanal) x CH ₄ 2 ³	0,49	0,24	<0,01
CMS (semanal) x CH ₄ 3 ⁴	0,49	0,23	<0,01

¹Grupo: CON = Bicarbonato de sódio; LITHO = *Lithothamnium calcareum*. ²RM = 4,08 × (acetato / propionato) + 7,05; ³RM = 3,28 × (acetato + butirato) / propionato + 7,6; ⁴RM = 316 / propionato + 4,4.

Tabela 4. Correlação entre as proporções de acetato, propionato e butirato com o CMS semanal (s) de vacas holandesas alimentadas com dietas suplementadas com bicarbonato de sódio (CON) ou *Lithothamnium calcareum* (LITHO).

Table 4. Correlation between acetate, propionate and butyrate proportions with weekly DMI(s) of Holstein cows fed diets supplemented with sodium bicarbonate (CON) or *Lithothamnium calcareum* (LITHO).

Grupo CON ¹			
	Valor de r	Valor de R ²	Valor de P
Acético x CMS (semanal)	-0,12	0,01	0,54
Propionico x CMS (semanal)	0,09	0,01	0,65
Butírico x CMS (semanal)	0,10	0,01	0,60
Grupo LITHO ¹			
	Valor de r	Valor de R ²	Valor de P
Acético x CMS (semanal)	0,40	0,16	0,03
Propionico x CMS (semanal)	-0,47	0,22	0,01
Butírico x CMS (semanal)	-0,28	0,08	0,14

¹Grupo: CON = Bicarbonato de sódio; LITHO = *Lithothamnium calcareum*.

A suplementação de algas vermelhas e de dietas ricas em amido rapidamente fermentáveis, favorecem a produção de propionato, devido ao desvio de hidrogênio para formação de propionato, resultando em menos hidrogênio disponível para metanogênese, portanto, a relação A/P no rúmen influencia na produção de CH₄ (MORGAVI et al. 2010, KINLEY et al. 2020), sendo essas dietas ricas em concentrado métodos eficientes para diminuir a produção de metano entérico (EUGÈNE et al. 2011).

SAUVANT & GIGER-REVERDIN (2009) observaram uma diminuição na produção de CH₄ quando a proporção de concentrado foi >40% do consumo de MS e EUGÉNE et al. (2011) observou diminuição das emissões entéricas de CH₄ em touros confinados suplementados com lipídeos extrusados de linhaça combinados com amido na dieta.

Estudos *in vitro* demonstraram uma redução de 99% de CH₄, diminuição do acetato e uma maior concentração de propionato com a suplementação da alga vermelha *Asparagopsis taxiformis* incluída a 2% da matéria orgânica da dieta (MACHADO et al. 2016) e estudos *in vivo* observaram diminuição da produção de CH₄ em vacas leiteiras em 26,4% e 67,2% com a suplementação de 0,5% e 1% da matéria orgânica de *Asparagopsis armata*, respectivamente (ROQUE et al. 2019). No entanto, até onde se sabe, os efeitos da alga vermelha *Lithothamnium calcareum* sobre a produção de CH₄ foram pouco testados em vacas leiteiras recebendo dietas ricas em amido.

A produção de CH₄ de vacas leiteiras pode ser prevista a partir das proporções de AGV no rúmen utilizando modelos de equações, sendo uma abordagem barata e prática de estimar as emissões de metano (NIU et al. 2018). No presente estudo, o rendimento de CH₄ previsto, não diferiu entre os tratamentos nos três modelos de equações testados. No entanto, a produção de CH₄ prevista, em ambos os grupos foi consistente com os mensurados por métodos tradicionais utilizados para medir a produção de CH₄, (WILLIAMS et al. 2019), ou seja, os parâmetros de AGV no fluido ruminal combinados com CMS medido ou estimado, oferecem uma ferramenta potencial para prever a produção de CH₄ em ruminantes.

A falta de diferença na produção de CH₄ entre as dietas LITHO e CON é consistente com a concentração do perfil de AGV, bem como, com a relação A/P que foram semelhantes entre os grupos, provavelmente não alterando a produção líquida de H₂, que é aumentada com a produção de acetato durante a fermentação ruminal, favorecendo a metanogênese, já a formação de propionato é uma via competitiva de utilização de H₂ no rúmen, reduzindo a disponibilidade de H₂ para a metanogênese (CAREGA & DANTAS 2017). Dessa forma, a produção de CH₄ é influenciada pelas taxas de produção de acetato e propionato ruminal (KINLEY et al. 2020).

Assim como, a suplementação com *Lithothamnium calcareum* não influenciou o CMS durante os 56 dias de experimento bem como, a produção de AGV e o rendimento de CH₄, também não houve uma correlação satisfatória entre o rendimento de CH₄ com o CMS e as proporções de acetato, propionato e butirato, discordando de WILLIAMS et al. (2019) que demonstrou no seu estudo que o rendimento de metano foi positivamente relacionado linearmente com as proporções de acetato e butirato, e o recíproco de propionato.

Na maioria dos estudos que avaliaram os efeitos de algas vermelhas na mensuração de metano, a produção de CH₄ foi reduzido, sendo relacionado com o aumento na produção de propionato ruminal e uma diminuição benéfica na relação A/P (MACHADO et al. 2016). KINLEY et al. (2020) demonstraram que uma inclusão de *Asparagopsis taxiformes* na TMR de alto grão em apenas 0,20% da ingestão da matéria orgânica (MO), altera o padrão de fermentação ruminal com diminuição do acetato e o aumento do propionato e pode eliminar fundamentalmente a produção entérica de CH₄ em comparação com a dieta controle em bovinos de corte. ROQUE et al. (2019) em um estudo com vacas leiteiras Holandesas em lactação, usando um TMR contendo algas marinhas a 1% da ingestão, relatou uma redução de CH₄ em 67% e LI et al. (2018) relatou redução de 80% na produção de CH₄ entérico com *Asparagopsis* oferecido a 3% da ingestão MO em ovelhas Merino e uma redução no acetato e aumento do propionato ruminal. Esses autores atribuíram esses resultados ao bromofórmio que é um potente agente antimetanogênico presente nessas algas vermelhas.

Embora *Lithothamnium calcareum* seja uma espécie de alga vermelha, não contém bromofórmio na sua composição, é composto basicamente de carbonato de cálcio e magnésio em uma estrutura polimorfa semelhante ao favo de mel que propicia um aumento da superfície específica de atuação prolongando o período de ação (DIAS 2000, NEVILLE et al. 2019), sendo muito utilizado como agente tamponante do pH ruminal em dietas altamente energéticas assim como o bicarbonato de sódio. No presente estudo, os resultados de pH ruminal demonstram que as dietas LITHO e CON mantiveram o pH em 6,71 e 6,79 respectivamente, favorecendo as bactérias metanogênicas, que são muito sensíveis a alterações no pH necessitando que este esteja o mais próximo da neutralidade (6,0 a 6,5) (BERCHIELLI et al. 2011), sendo assim, mesmo sendo fornecida uma dieta com alto amido, a suplementação com *Lithothamnium calcareum* não reduziu a mitigação de metano, corroborando o estudo de SIMANUNGKALIT et al. (2023) onde o rendimento CH₄ (g/kg de CMS) de novilhos suplementados com *Lithothamnium calcareum* foi superior aos de novilhos do grupo monensina.

Portanto, pode-se concluir que a suplementação de *Lithothamnium calcareum* em dietas com alto amido, não reduziu a produção estimada de CH₄ entérico, em comparação a uma dieta padrão com bicarbonato de sódio, a partir de equações baseadas nas proporções de ácidos graxos voláteis ruminais em vacas Holandesas em lactação, ademais não houve relação do CMS com a produção do gás. No entanto, é necessário que mais estudos sejam realizados para elucidar o efeito de *Lithothamnium calcareum* como um aditivo alimentar antimetanogênico para vacas leiteiras, não enfatizando apenas dietas energéticas, mas também outros tipos de dieta.

REFERÊNCIAS

- BERCHIELLI TT et al. 2011. Nutrição de Ruminantes. Jaboticabal: Funep.
- CAREGA MFCS & DANTAS A. 2017. Metano ruminal e o uso de taninos condensados como estratégia de mitigação. *Nucleus Animalium* 9: 51-64.
- CHARMLEY E et al. 2016. A universal equation to predict methane production of forage-fed cattle in Australia. *Animal Production Science* 56: 169–180.
- DIAS GTM. 2000. Granulados bioclásticos: algas calcárias. *Brazilian Journal of Geophysics* 18: 1-19.
- EUGÈNE M et al. 2011. Dietary linseed and starch supplementation decreases methane production of fattening bulls. *Animal Feed Science and Technology* 166: 330–337.
- HAMMOND KJ et al. 2015. Methane emissions from cattle: Estimates from short-term measurements using a GreenFeed system compared with measurements obtained using respiration chambers or sulphur hexafluoride tracer. *Animal Feed Science and Technology* 203: 41–52.
- JMP®, Version Pro 14. SAS Institute Inc., Cary, NC, 1989–2024.
- KINLEY RD et al. 2020. Mitigating the carbon footprint and improving productivity of ruminant livestock agriculture using a red seaweed. *Journal of Cleaner Production* 259: 120836.
- LI X et al. 2018. *Asparagopsis taxiformis* decreases enteric methane production from sheep. *Anim. Prod. Sci.* 58: 681- 688.
- MACHADO L et al. 2016. Dose-response effects of *Asparagopsis taxiformis* and *Oedogonium* sp. on in vitro fermentation and methane production. *Journal of Applied Phycology* 28: 1443-1452.
- MAIA MRG et al. 2016. The potential role of seaweeds in the natural manipulation of rumen fermentation and methane production. *Scientific Reports* 6: 32321.
- MORGAVI D et al. 2010. Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Animal* 4: 1024-1036.
- NEVILLE EW et al. 2022. Effects of calcareous marine algae on milk yield, feed intake, energy balance, mineral status, and inflammatory markers in transition dairy cows. *Journal of Dairy Science* 105: 6616–6627.
- NEVILLE EW et al. 2019. The effect of calcareous marine algae, with or without marine magnesium oxide, and sodium bicarbonate on rumen pH and milk yield in mid lactation dairy cows. *Journal of Dairy Science* 102: 8027-8039.
- NIU M et al. 2018. Prediction of enteric methane production, yield, and intensity in dairy cattle using an intercontinental database. *Global Change Biology* 24: 3368–3389.
- ROQUE BM et al. 2019. Inclusion of *Asparagopsis armata* in lactating dairy cows' diet reduces enteric methane emission by over 50 percent. *Journal of Cleaner Production*. 234: 132-138.
- SAUVANT D & GIGER-REVERDIN S. 2009. Modélisation des interactions digestives et de la production de méthane. *INRAE Productions Animales* 22: 375–384.
- SIMANUNGKALIT G et al. 2023. The effects of antibiotic-free supplementation on the ruminal pH variability and methane emissions of beef cattle under the challenge of subacute ruminal acidosis (SARA). *Research in Veterinary Science*. 160:30-38.
- WANG M et al. 2021. Comparison of HPLC and NMR for quantification of the main volatile fatty acids in rumen digesta. *Scientific Reports* 11: 1-15.
- WILLIAMS SRO et al. 2019. Volatile Fatty Acids in Ruminal Fluid Can Be Used to Predict Methane Yield of Dairy Cows. *Animals* 9: 1006

4.3 Manuscrito 3

Manuscrito a ser submetido a revista Semina: Ciências Agrárias

Iron and hepcidin concentrations as potential markers of systemic inflammation in dairy cows supplemented with *Lithothamnium calcareum* and challenged with a high-starch diet

Concentrações de ferro e hepcidina como potenciais marcadores de inflamação sistêmica em vacas leiteiras suplementadas com *Lithothamnium calcareum* e desafiadas com dieta rica em amido

Magna Fabrícia Brasil Savela^{1*}, Uriel Secco Londero², Laura Valadão Vieira¹, Leonardo Marins¹, Viviane Rabassa Rabassa³, Eliza Rossi Komninou³, Francisco Augusto Del Pino³; Thais Casarin², Raqueli Terezinha França³, Marcio N. Corrêa³

¹Doutorandos da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Pelotas, RS, Brasil.

E-mails: fabibrasil93@gmail.com; lauravaladaovieira@gmail.com lndmarins@gmail.com

² Pós-doutorandos em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Pelotas, RS, Brasil.

E-mail:uriel_londero@hotmail.com

³ Professores Doutores da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Pelotas, RS, Brasil.

E-mails: fabdelpino@gmail.com; raquelifranca@gmail.com; vivianerabassa@gmail.com; elizarossikom@gmail.com; correa.marcio@ufpel.edu.br

*Autor correspondente

Abstract

Rumen buffers are widely used feed additives in dairy cow diets to maintain ruminal pH within appropriate physiological limits, helping to prevent subacute ruminal acidosis (SARA). This condition is common in animals fed high-starch diets, which promote intense ruminal fermentation, leading to a drop in pH, lysis of Gram-negative bacteria, and release of lipopolysaccharides (LPS). These LPS can translocate through the ruminal wall, reach systemic circulation, and trigger inflammatory responses, compromising animal health and performance. Considering the ruminal and inflammatory disturbances associated with high-starch diets, especially in high-producing dairy cows, this study aimed to evaluate the effect of dietary supplementation with the marine-derived rumen buffer *Lithothamnium calcareum* on ruminal pH and serum levels of iron and hepcidin. Furthermore, the study investigated the correlation between these indicators and metabolic parameters to explore the potential of iron and hepcidin as biomarkers of systemic inflammation in animals under diet-induced fermentative challenge. A total of thirty-six multiparous Holstein dairy cows were assigned to two experimental groups: the control group (CON; $n = 18$), supplemented with sodium bicarbonate at 1.1% of dry matter intake (DMI), and the *Lithothamnium calcareum* group (LITHO; $n = 18$), supplemented with *Lithothamnium calcareum* at 0.5% of DMI. Ruminal fluid was collected weekly for pH evaluation. Individual DMI was recorded daily using automatic feeders. Blood samples were collected on days 0, 21, 42, and 60 of the experiment to determine serum levels of iron, hepcidin, and other metabolic parameters, including total proteins, albumin, magnesium, total calcium, urea, glucose, paraoxonase 1 (PON-1), non-esterified fatty acids (NEFA), and beta-hydroxybutyrate (BHB). No significant differences were observed in serum iron and hepcidin levels between the experimental groups ($P > 0.05$). Correlations between serum iron, hepcidin, and metabolic parameters remained similar across treatments. In both groups, a positive association between iron and albumin was observed — in the CON group ($r = 0.35$; $P < 0.01$) and in the LITHO group ($r = 0.24$; $P = 0.04$). Only in the CON group was a positive correlation also found between iron and urea ($r = 0.27$; $P = 0.02$). As for hepcidin, the correlations observed were of low magnitude and distributed differently between groups. In the LITHO group, hepcidin was positively correlated with PON-1 ($r = 0.34$; $P = 0.04$) and negatively with glucose ($r = -0.36$; $P = 0.02$). In the CON group, a positive correlation was observed between hepcidin and BHB ($r = 0.37$; $P = 0.01$). In conclusion, supplementation with *Lithothamnium calcareum* in high-starch diets was effective in maintaining ruminal pH within physiologically adequate levels, without causing significant changes in serum levels of iron and hepcidin compared to sodium bicarbonate. Nonetheless, the findings highlight the need to further understand the

regulation of these biomarkers in the context of fermentative and inflammatory challenges, particularly in high-producing dairy cows.

Keywords: rumen buffer, marine algae, subacute ruminal acidosis, inflammation, inflammatory biomarkers.

Resumo

Tampões ruminais são aditivos amplamente utilizados na dieta de vacas leiteiras com o objetivo de manter o pH ruminal dentro de limites fisiológicos adequados, contribuindo para a prevenção da acidose ruminal subaguda (SARA). Essa condição é frequente em animais alimentados com dietas ricas em amido, que promovem intensa fermentação ruminal, levando à queda do pH, lise de bactérias Gram-negativas e liberação de lipopolissacarídeos (LPS). Esses LPS podem translocar-se através da parede ruminal, alcançar a circulação sistêmica e ativar respostas inflamatórias, comprometendo a saúde e o desempenho dos animais. Considerando os distúrbios ruminais e inflamatórios associados a dietas amiláceas, especialmente em vacas leiteiras de alta produção, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da suplementação com o tampão ruminal *Lithothamnium calcareum* sobre o pH ruminal e os níveis séricos de ferro e hepcidina. Além disso, buscou-se investigar a correlação entre esses indicadores e parâmetros metabólicos, com o intuito de explorar o potencial do ferro e da hepcidina como biomarcadores de inflamação sistêmica em animais submetidos a desafios fermentativos induzidos pela dieta. Para a realização do estudo, trinta e seis vacas lactantes multíparas da raça Holandesa foram distribuídas em dois grupos experimentais: grupo controle (CON; n=18), suplementado com bicarbonato de sódio a 1,1%/kg de matéria seca, e grupo *Lithothamnium calcareum* (LITHO; n=18), suplementado com *Lithothamnium calcareum* a 0,5%/kg de matéria seca. Coletas de líquido ruminal foram realizadas semanalmente para avaliação do pH. O consumo individual de matéria seca foi registrado diariamente por meio de alimentadores automáticos. Amostras de sangue foram coletadas nos dias 0, 21, 42 e 60 do experimento para determinação dos níveis séricos de ferro, hepcidina e outros parâmetros metabólicos, incluindo proteínas totais, albumina, magnésio, cálcio total, ureia, glicose, paraoxonase 1 (PON-1), ácidos graxos não esterificados (NEFA) e betahidroxibutirato (BHB). Não foram observadas diferenças significativas nos níveis séricos de ferro e hepcidina entre os grupos experimentais ($P > 0,05$). As correlações entre o ferro sérico, hepcidina e os parâmetros metabólicos mantiveram-se semelhantes entre os tratamentos. Em ambos os grupos, verificou-se associação positiva entre ferro e albumina no grupo CON ($r = 0,35$; $P < 0,01$) e no grupo LITHO ($r = 0,24$; $P = 0,04$).

Apenas no grupo CON, o ferro também apresentou correlação positiva com a ureia ($r = 0,27$; $P = 0,02$). Quanto à hepcidina, as correlações observadas foram de baixa magnitude e distribuídas de forma distinta entre os grupos. No grupo LITHO, a hepcidina correlacionou-se positivamente com a PON-1 ($r = 0,34$; $P = 0,04$) e negativamente com a glicose ($r = -0,36$; $P = 0,02$). No grupo CON, observou-se correlação positiva entre hepcidina e BHB ($r = 0,37$; $P = 0,01$). Conclui-se, portanto, que a suplementação com *Lithothamnium calcareum* em dietas ricas em amido foi eficaz na manutenção do pH ruminal em níveis fisiologicamente adequados, sem promover alterações significativas nos níveis séricos de ferro e hepcidina quando comparada ao uso de bicarbonato de sódio. Ainda assim, os resultados indicam a necessidade de aprofundar a compreensão sobre a regulação desses biomarcadores no contexto de desafios fermentativos e inflamatórios, particularmente em vacas leiteiras de alta produção.

Palavras-chave: tampão ruminal, algas marinhas, acidose ruminal subaguda, inflamação, marcadores inflamatórios.

Introdução

A utilização de dietas altamente energéticas, caracterizadas por elevado teor de amido e baixo teor de fibras, é uma estratégia amplamente adotada para maximizar a produção de vacas leiteiras, sobretudo durante o início e o pico da lactação (Srivastava et al., 2021). No entanto, esse tipo de alimentação pode impactar negativamente a dinâmica ruminal, resultando na redução do pH e em alterações na produção e composição dos ácidos graxos voláteis (AGV), essenciais para a saúde e o desempenho dos ruminantes (Mu et al., 2023).

A redução do pH ruminal aumenta o risco de desenvolvimento da acidose ruminal subaguda (SARA), um distúrbio que compromete a produção, a saúde e o bem-estar dos animais (Golder et al., 2023). Além disso, a SARA reduz a eficiência na utilização de nutrientes, prejudica a digestão microbiana — especialmente de fibras — no rúmen e intestino, e frequentemente desencadeia um processo inflamatório sistêmico (Voulgarakis et al., 2023). A inflamação sistêmica induzida pela SARA ocorre quando a acidificação ruminal, associada à liberação de toxinas provenientes da morte de microrganismos ruminais, aumenta a permeabilidade do epitélio ruminal e intestinal. Esse aumento permite a translocação dessas toxinas para a circulação sistêmica (Plaizer et al., 2018; Nasrollahi, 2023). Uma vez na corrente sanguínea, essas toxinas ativam a cascata pró-inflamatória, estimulando a secreção de marcadores inflamatórios, como proteínas de fase aguda, interleucinas (IL-1, IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (Plaizer et al., 2008, 2018).

O diagnóstico da SARA pode ser realizado por meio da mensuração direta do pH ruminal, da observação de alterações no comportamento animal (Beauchemin, 2018) e por meio de exames bioquímicos indicativos de processos inflamatórios, como a dosagem de proteínas de fase aguda (PFA), que são altamente sensíveis à presença de inflamação. No entanto, a avaliação desses marcadores apresenta custo elevado, o que pode limitar sua aplicação em larga escala (Thomas et al., 2016).

O ferro é um micronutriente essencial tanto para os organismos animais quanto para os microrganismos patogênicos. Nos animais, ele participa de processos fundamentais como transporte de oxigênio, atividade enzimática, metabolismo energético e síntese de DNA (Erkilic et al., 2016). Ao mesmo tempo, o ferro é crucial para a proliferação e virulência de diversas bactérias, por ser cofator de múltiplas enzimas microbianas (Nemeth & Ganz, 2023). Assim, o organismo do hospedeiro desenvolveu mecanismos específicos para regular a disponibilidade de ferro durante processos infecciosos e inflamatórios (Zebelli et al., 2010).

Durante inflamações agudas ou crônicas, as concentrações séricas de ferro tendem a diminuir, fenômeno conhecido como hipoferremia da inflamação, resultado da ativação da resposta de fase aguda (Baydar & Dabak, 2014). A principal reguladora dessa homeostase é a hepcidina, uma proteína peptídica produzida pelos hepatócitos, cuja expressão é fortemente estimulada pelas citocinas inflamatórias interleucina-6 (IL-6) e interleucina-1 (IL-1) (Erkilic et al., 2016; Nemeth & Ganz, 2023). A hepcidina se liga à ferroportina, proteína transportadora responsável pela exportação de ferro dos enterócitos, macrófagos e hepatócitos para a circulação sistêmica (Murakami et al., 2023). Após essa ligação, a ferroportina sofre internalização, ubiquitinação e degradação, resultando na retenção do ferro dentro das células e na redução da sua disponibilidade plasmática (Murakami et al., 2023).

Esse bloqueio no fluxo de ferro para o plasma limita sua utilização na eritropoiese e pode levar à anemia da inflamação ou anemia por infecção, caracterizada pela baixa disponibilidade de ferro para a síntese de hemoglobina, apesar de haver reservas corporais adequadas, adicionalmente, durante processos infecciosos, o organismo intensifica estratégias para restringir ainda mais o acesso do ferro aos patógenos (Nemeth & Ganz, 2023).

Diversas proteínas participam desse processo de sequestro do ferro: a transferrina circula no plasma transportando ferro ligado, enquanto a lactoferrina, liberada principalmente por neutrófilos ativados, se liga ao ferro livre nos tecidos inflamados, tornando-o indisponível para bactérias (Murakami et al., 2023). A haptoglobina, outra proteína de fase aguda, se liga à hemoglobina liberada após lise de hemácias, evitando que o ferro seja acessado por microrganismos. Em contrapartida, muitas bactérias secretam sideróforos, moléculas com alta

afinidade por ferro, como estratégia para sequestrar esse mineral do hospedeiro. No entanto, os mamíferos podem neutralizar esses sideróforos bacterianos por meio da siderocalina (ou lipocalina-2), uma glicoproteína produzida no fígado, baço e macrófagos, que se liga aos sideróforos e impede o reaproveitamento do ferro pelas bactérias (Murakami et al., 2023; Nemeth & Ganz, 2023).

Por fim, vale destacar o papel dos macrófagos na reciclagem do ferro, a partir da fagocitose de eritrócitos envelhecidos. O ferro liberado da hemoglobina é exportado via ferroportina e retorna à circulação, contudo, na vigência de inflamação, esse fluxo é interrompido pela ação da hepcidina, impedindo a liberação do ferro reciclado (Murakami et al., 2023). Em animais saudáveis, a produção de hepcidina é regulada por mecanismos como a disponibilidade de ferro, hipóxia e demanda eritropoiética. Já em estados inflamatórios, predomina a sinalização mediada por IL-6 e IL-1, levando ao aumento da hepcidina, supressão da ferroportina, hipoferremia e comprometimento da eritropoiese (Erkilic et al., 2016; Nemeth & Ganz, 2023).

Dessa forma, a redução das concentrações séricas de ferro, associada à elevação dos níveis de hepcidina, tem sido relacionada à presença de infecções, inflamações e estresse oxidativo em diferentes espécies, como humanos (Suega et al., 2019), camundongos (Pagani et al., 2011), cães, gatos (Chikazawa & Dunning, 2016; Qasim & Badawi, 2023) e éguas (Satué et al., 2023). No entanto, ainda são escassos os estudos que avaliam a relação entre ferro sérico e hepcidina como ferramenta diagnóstica para inflamação aguda em bovinos (Erkilic et al., 2016). A dosagem de ferro sérico, por ser de baixo custo e de fácil aplicação, apresenta potencial para ser utilizada como marcador inflamatório alternativo, contribuindo para a avaliação da saúde do rebanho (Murakami et al., 2023).

Com o intuito de prevenir a SARA e o desenvolvimento de inflamação sistêmica nos animais, tampões ruminais são comumente adicionados a dietas altamente energéticas. *Lithothamnium calcareum* é uma alga marinha que tem sido amplamente estudada nos últimos anos pelo seu potencial em promover a saúde ruminal (Neville et al., 2019; Neville et al., 2022). Neste estudo, levantamos a hipótese de que vacas suplementadas com *Lithothamnium calcareum* e desafiadas com uma dieta rica em amido apresentarão um tamponamento eficaz do pH ruminal, o que contribuirá para a prevenção de processos inflamatórios e para a manutenção dos níveis séricos de ferro e hepcidina.

Dessa forma, considerando os distúrbios ruminais e inflamatórios desencadeados por dietas ricas em amido, especialmente em vacas leiteiras de alta produção, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da suplementação com o tampão ruminal de origem marinha

Lithothamnium calcareum sobre o pH ruminal e os níveis séricos de ferro e hepcidina, além de investigar a correlação entre esses parâmetros e indicadores metabólicos. A proposta visa explorar o potencial do ferro e da hepcidina como biomarcadores de inflamação sistêmica em animais submetidos a desafios nutricionais fermentativos.

Materiais e métodos

Animais, desenho experimental e tratamento

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas, registrado sob o número 13784-2021. A pesquisa foi conduzida em uma propriedade leiteira comercial localizada no município de Rio Grande, estado do Rio Grande do Sul, Brasil, nas coordenadas geográficas 32°16'S e 52°32'O.

Foram utilizadas 36 vacas da raça Holandesa, multíparas, com $63,74 \pm 18,63$ dias em lactação (DEL), peso médio de 694 ± 20 kg, paridade média de $3 \pm 0,59$ lactações e produção de leite pré-experimental de $38,83 \pm 9,29$ kg/dia. As vacas foram mantidas em um galpão com sistema compost barn, com cama composta por maravalha e casca de arroz, e tiveram acesso a alimentadores automatizados e individuais (Intergado®, Minas Gerais, Brasil), além de água *ad libitum*.

As vacas foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos experimentais: Controle (CON) e *Lithothamnium calcareum* (LITHO), ambos compostos por 18 animais, durante um período experimental de 60 dias. Os grupos foram manejados conjuntamente ao longo de todo o experimento. Ambos os grupos receberam a mesma dieta basal, fornecida na forma de ração total misturada (TMR) (Tabela 1), com relação concentrado:volumoso de 54:46% e teor de amido de 29,28%. A diferença entre os tratamentos consistiu na inclusão de *Lithothamnium calcareum* a 0,5% da matéria seca (MS) da dieta no grupo LITHO, enquanto o grupo CON recebeu 1,1% da MS da dieta em bicarbonato de sódio, conforme recomendação do nutricionista da fazenda. Ambos os tamponantes foram previamente incorporados à TMR antes da oferta no cocho.

Consumo de matéria seca (CMS), análises de sangue e líquido ruminal

Diariamente, os dados de consumo individual de matéria verde (kg/dia) foram registrados por meio dos alimentadores automatizados (Intergado®, Minas Gerais, Brasil), sendo posteriormente convertidos em consumo de matéria seca (CMS, kg/dia).

Amostras de sangue foram coletadas por punção no complexo arteriovenoso coccígeo utilizando sistema a vácuo (Vacutainer®, BD Diagnostics, São Paulo, Brasil) nos dias 0 (antes do início da suplementação com os tamponantes), 21, 42 e 60 do experimento. As amostras foram utilizadas para análise das concentrações séricas de ferro, hepcidina, proteínas plasmáticas totais (PPT), albumina, magnésio, cálcio total, ureia, paraoxonase 1 (PON-1), ácidos graxos não esterificados (NEFA) e beta-hidroxibutirato (BHB). As concentrações de ferro, proteínas totais, albumina, magnésio, cálcio, ureia, glicose, NEFA e BHB foram mensuradas em analisador bioquímico automático (Labmax Plenno, Labtest®, Minas Gerais, Brasil), utilizando kits comerciais e seguindo as recomendações do fabricante (Labtest®, Minas Gerais, Brasil). A análise da PON-1 foi realizada utilizando um espectrofotômetro (Femto, 700 Plus) e a concentração de hepcidina foi determinada por meio do método ELISA (ELK Biotechnology, Wuhan, China).

Amostras de líquido ruminal foram coletadas por ruminocentese de três animais por grupo, realizadas quatro horas após a alimentação matinal nos dias 0 (antes da suplementação com alga e bicarbonato de sódio), 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56 e 60 do experimento. O pH do líquido ruminal foi medido imediatamente após a coleta, utilizando um medidor de pH de bancada (pHmetro AKSO® PY-41, São Leopoldo, Brasil).

Amostras da dieta foram coletadas duas vezes por semana para avaliação da matéria seca (MS), determinada conforme a técnica descrita por Nogueira et al. (2021). As amostras da TMR foram analisadas quanto ao teor de matéria orgânica e cinzas, de acordo com os métodos descritos pela AOAC (1995). A análise de proteína bruta (PB) foi realizada com base na metodologia de Kjeldahl (AOAC, 1995). As análises de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA), ambas corrigidas para cinzas, seguiram o método proposto por Van Soest e Robertson (1985).

Análise dos dados

Os dados foram analisados utilizando o software estatístico RStudio, por meio de modelos mistos (mixed models), considerando como efeitos fixos o grupo experimental, o momento das coletas e a interação entre esses fatores, para as variáveis pH ruminal, ferro e hepcidina.

Também foi realizada análise de correlação bivariada entre os parâmetros metabólicos (ferro, hepcidina, proteínas totais, albumina, magnésio, cálcio total, ureia, glicose, NEFA e BHB). A significância estatística foi considerada quando $P \leq 0,05$.

Resultados

Os resultados dos efeitos da suplementação com *Lithothamnium calcareum* e bicarbonato de sódio sobre os níveis séricos de Ferro e hepcidina estão apresentados na Tabela 2. Além disso, a evolução desses parâmetros ao longo das coletas está ilustrada nas Figuras 1 (ferro) e 2 (hepcidina). Os valores de pH ruminal, medidos quatro horas após a alimentação matinal, não apresentaram diferenças significativas entre os grupos LITHO e CON (6.70 ± 0.11 e 6.80 ± 0.11 , respectivamente; $P > 0,05$).

As correlações entre os níveis séricos de ferro e hepcidina com os parâmetros metabólicos estão apresentadas na Tabela 3 (grupo LITHO) e na Tabela 4 (grupo CON).

As concentrações séricas de ferro e hepcidina não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais ($P > 0,05$), indicando que a substituição do bicarbonato de sódio por *Lithothamnium calcareum* não promoveu alterações relevantes nesses biomarcadores. As correlações entre os níveis séricos de ferro e os parâmetros metabólicos mantiveram-se semelhantes entre os tratamentos. Destaca-se a associação positiva entre ferro e albumina, observada tanto no grupo controle ($r = 0,35$; $P < 0,01$) quanto no grupo suplementado com alga ($r = 0,24$; $P = 0,04$), sugerindo uma possível relação entre o status ferro-proteico e a integridade funcional hepática. No grupo controle, o ferro também apresentou correlação positiva com a ureia ($r = 0,27$; $P = 0,02$), o que pode refletir a dinâmica do metabolismo proteico, embora sem indícios de relevância clínica.

Quanto à hepcidina, as correlações identificadas foram de baixa magnitude e distribuídas de forma distinta entre os tratamentos. No grupo suplementado com *Lithothamnium calcareum*, observou-se correlação positiva com a paraoxonase-1 (PON-1) ($r = 0,34$; $P = 0,04$) e negativa com a glicose ($r = -0,36$; $P = 0,02$), enquanto no grupo controle a hepcidina correlacionou-se positivamente com os níveis de β -hidroxibutirato (BHB) ($r = 0,37$; $P = 0,01$). Apesar da significância estatística, a fraca intensidade dessas associações e a permanência dos valores dentro dos intervalos fisiológicos sugerem que tais correlações refletem flutuações metabólicas sutis, sem implicações clínicas evidentes ou efeitos patológicos decorrentes da intervenção nutricional.

Discussão

A alimentação de vacas leiteiras com dietas ricas em amido, sem um tamponamento adequado do rúmen, eleva o risco de ocorrência de acidose ruminal. Esse desequilíbrio no

ambiente ruminal leva à morte de bactérias Gram-negativas, resultando na liberação de lipopolissacarídeos (LPS) no fluido ruminal. Os LPS podem atravessar a parede do rúmen e alcançar a circulação portal, desencadeando uma resposta inflamatória sistêmica de fase aguda (Guo et al., 2022). No entanto, ainda são escassas as informações sobre os efeitos dessa inflamação sistêmica, decorrente da acidose ruminal, sobre a hepcidina e o metabolismo do ferro, bem como sua correlação com parâmetros metabólicos (Ganz & Nemeth, 2012; Wysocka et al., 2020).

No estudo de Zebelli et al. (2010), foram observadas concentrações plasmáticas reduzidas de cálcio, ferro e zinco durante a resposta inflamatória em vacas, alterações estas associadas ao aumento de LPS ruminal induzido pela maior ingestão de concentrado. De maneira semelhante, Antanaítis et al. (2019) relataram uma redução nas concentrações de ferro em vacas com SARA, em comparação com animais clinicamente saudáveis. Além disso, Tsukano et al. (2019, 2020) demonstraram que as concentrações séricas de ferro diminuíram significativamente em bovinos de corte acometidos por doenças respiratórias e em bezerros nas primeiras 24 horas após a descorna. Da mesma forma, Baydar e Dabak (2014) relataram diminuição na concentração sérica de ferro em vacas com mastite e com retículo-pericardite traumática, em comparação com animais saudáveis. Complementarmente, Murakami et al. (2023) observaram valores séricos inferiores de ferro em vacas com doenças inflamatórias. Coletivamente, esses estudos sugerem que a análise sérica de ferro pode representar uma ferramenta útil no diagnóstico de processos inflamatórios em bovinos.

No presente estudo, vacas dos grupos LITHO e CON, ambas recebendo dietas ricas em amido, não apresentaram alterações nas concentrações séricas de ferro, mantendo também o pH ruminal dentro dos valores fisiológicos. Esses resultados sugerem que ambos os tratamentos foram eficazes no controle da SARA, não desencadeando resposta inflamatória nos animais. As concentrações fisiológicas observadas de ferro e hepcidina, aliadas à ausência de correlação significativa entre esses metabólitos, reforçam a inexistência de um processo inflamatório sistêmico nos grupos experimentais. Adicionalmente, foi observada uma correlação positiva entre ferro e albumina em ambos os grupos. Considerando que a albumina é uma proteína de fase aguda negativa, cujos níveis tendem a diminuir na presença de inflamação (Saco & Bassols, 2023), sua manutenção dentro dos valores fisiológicos apoia a ausência de resposta inflamatória.

Da mesma forma que os níveis séricos de ferro, não foram observadas diferenças significativas nos níveis de hepcidina entre os grupos avaliados. Esse achado pode estar relacionado ao fato de que todos os animais apresentavam-se clinicamente saudáveis e dentro

dos parâmetros fisiológicos da espécie, sugerindo uma condição de homeostase metabólica e ausência de processos inflamatórios sistêmicos relevantes. Embora ainda existam poucos estudos voltados à avaliação da hepcidina como marcador inflamatório em ruminantes, evidências crescentes demonstram que sua síntese é estimulada durante condições patológicas associadas à inflamação, principalmente por meio da ativação da via da interleucina-6 (IL-6) (Nemeth & Ganz, 2023).

Em contextos inflamatórios, ocorre um aumento na concentração sistêmica de IL-6, a qual estimula os hepatócitos a produzirem hepcidina. Essa, por sua vez, atua bloqueando a saída de ferro das células — como hepatócitos, enterócitos e macrófagos — ao se ligar à ferroportina, proteína responsável pela exportação de ferro para o plasma. Com essa ação, a hepcidina reduz a disponibilidade sistêmica de ferro, limitando o acesso desse micronutriente essencial aos patógenos, contribuindo assim para o controle da replicação microbiana. Estudos em ruminantes corroboram esse papel da hepcidina como reguladora imunometabólica: Basbugan et al. (2019) relataram aumento de seus níveis em bovinos com theileriose; Sevgisunar e Sahinduran (2021) observaram o mesmo em cabras com paratuberculose; e Dörtkardes e Sahinduran (2020) relataram elevação da hepcidina em bezerros com pneumonia viral. Esses dados reforçam a hipótese de que a hepcidina atua como elo entre os sistemas imunológico e ferro-regulatório (Ganz & Nemeth, 2012). Portanto, a ausência de variações nos níveis de hepcidina no presente estudo reforça o caráter fisiológico das condições observadas e sugere que, na ausência de um desafio inflamatório, esse hormônio permanece estável, mesmo frente a alterações metabólicas discretas.

Uma correlação positiva fraca entre as concentrações de hepcidina e alguns parâmetros metabólicos foi observada, sendo essa associação positiva com a PON-1 e negativa com a glicose no grupo LITHO. No grupo CON, a hepcidina apresentou correlação positiva com o BHB. Apesar dessas associações, todos os metabólitos avaliados permaneceram dentro dos limites fisiológicos estabelecidos para a espécie bovina (Kaneko et al., 2008), o que sugere que tais correlações não refletem alterações patológicas, mas possivelmente indicam variações individuais ou adaptações metabólicas sutis. A correlação com a PON-1 pode estar relacionada à interação entre a homeostase do ferro e os mecanismos antioxidantes, uma vez que essa enzima está envolvida na defesa contra o estresse oxidativo (Ferretti et al., 2010; Taha et al., 2016). Já a correlação negativa com a glicose pode refletir algum grau de regulação cruzada entre o metabolismo energético e a síntese de hepcidina, ainda que os mecanismos exatos permaneçam pouco esclarecidos em ruminantes (Ganz & Nemeth, 2012). A associação com o BHB, um importante marcador do metabolismo lipídico, reforça a hipótese de que a hepcidina

possa ser modulada não apenas por fatores inflamatórios, mas também por alterações no perfil metabólico, mesmo em situações fisiológicas (Nemeth & Ganz, 2023). Esses achados destacam a complexidade da regulação da hepcidina e sua potencial sensibilidade a variações metabólicas discretas, reforçando a necessidade de mais estudos para elucidar suas interações em ruminante.

Os resultados do presente estudo sugerem que tanto o *Lithothamnium calcareum* quanto o bicarbonato de sódio foram eficazes no controle do desenvolvimento da SARA e na prevenção da translocação de endotoxinas para a circulação sanguínea. No entanto, são necessárias mais pesquisas para confirmar esses achados e compreender melhor os mecanismos envolvidos. Os efeitos positivos do *Lithothamnium calcareum* sobre o pH ruminal já foram relatados por Cruywagen et al. (2015) e Neville et al. (2019). Além disso, O'Gorman et al. (2012) descreveram os efeitos anti-inflamatórios dessa alga em roedores, e Neville et al. (2022) observaram redução nos níveis de proteínas de fase aguda em vacas leiteiras suplementadas com *Lithothamnium calcareum*. Esses dados contribuíram para a formulação da hipótese de que o *Lithothamnium calcareum* seria eficaz no controle da SARA e na prevenção da translocação de endotoxinas, mantendo os níveis séricos de hepcidina e ferro inalterados.

Conclusão

Conclui-se que a suplementação com *Lithothamnium calcareum* em dietas ricas em amido para vacas leiteiras não resultou em diferenças nas concentrações de ferro e hepcidina em comparação ao grupo controle suplementado com bicarbonato de sódio. Esses achados sugerem que ambos os tampões foram igualmente eficazes no controle da SARA e na prevenção de processos inflamatórios associados. No entanto, investigações adicionais são necessárias para confirmar esses resultados e elucidar com maior profundidade os mecanismos de ação envolvidos.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Universidade Federal de Pelotas (UFPel), ao Núcleo de Pesquisa, Ensino, Extensão e Inovação em Pecuária (NUPEEC Hub), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento deste projeto, bem como pela concessão de bolsas.

Referências bibliográficas

AOAC International (1995) Official Methods of Analysis. 16th ed. AOAC International.

Antanaitis, R., Juozaitienė, V., Malašauskienė, D., & Televičius, M. (2019). Can rumination time and some blood biochemical parameters be used as biomarkers for the diagnosis of subclinical acidosis and subclinical ketosis? *Veterinary and Animal Science*, 8, 100077. doi: 10.1016/j.vas.2019.100077

Basbugan, Y., Yuksek, N. A. Z. M. I., & Kılınç, O. O. (2019). Relation between hepcidin levels and hematologic parameters in cattle with theileriosis. *Medycyna Weterynaryjna*, 75(6), 355–359. doi: 10.21521/mw.6205

Baydar, E., & Dabak, M. (2014). Serum iron as an indicator of acute inflammation in cattle. *Journal of Dairy Science*, 97(1), 222–228. doi: 10.3168/jds.2013-6939

Beauchamin, K. A. (2018). Invited review: Current perspectives on eating and rumination activity in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 101, 4762–4784. doi: 10.3168/jds.2017-13706

Beigh, U. A., Ahmad, H., Ganai, A. M., & Masood, D. (2018). Blood metabolic profile of lambs fed complete diet supplemented with exogenous fibrolytic enzymes cocktail. *Journal of Animal Health and Production*, 6, 96–102. doi: 10.17582/journal.jahp/2018/6.4.96.102

Cruywagen, C. W., Taylor, S., Beya, M. M., & Calitz, T. (2015). The effect of buffering dairy cow diets with limestone, calcareous marine algae, or sodium bicarbonate on ruminal pH profiles, production responses, and rumen fermentation. *Journal of Dairy Science*, 98, 5506–5514. doi: 10.3168/jds.2014-8875

Dörtkardeş, A. B., & Şahinduran, S. (2020). Determination of serum amyloid A, haptoglobin and hepcidin levels in calves with endemic viral pneumonia. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 67, 127–131. doi: 10.33988/auvfd.523958

Erkilic, E. E., Erdogan, H. M., Ogun, M., Kirmizigul, A. H., Gokce, E., Kuru, M., & Kukurt, A. (2016). Relationship between hepcidin and oxidant/antioxidant status in calves with suspected neonatal septicemia. *Veterinary World*, 9(11), 1238. doi: 10.14202/vetworld.2016.1238-1241

- Ferretti, G., Bacchetti, T., Busni, D., Rabini, R. A., & Curatola, G. (2010). Protective effect of paraoxonase activity in high-density lipoproteins against erythrocyte membrane peroxidation: a comparison between healthy and type 2 diabetic patients. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 95(6), 2937–2942. doi: 10.1210/jc.2003-031897
- Ganz, T., & Nemeth, E. (2012). Hepcidin and iron homeostasis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1823(9), 1434–1443. doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.01.014
- Golder, H. M., LeBlanc, S. J., Duffield, T., Rossow, H. A., Bogdanich, R., Hernandez, L., ... & Lean, I. J. (2023). Characterizing ruminal acidosis risk: A multiherd, multicountry study. *Journal of Dairy Science*, 106(5), 3155–3175. doi: 10.3168/jds.2022-22571
- Guo, J., Xu, L., Khalouei, H., Fehr, K., Senaratne, V., Ghia, J. E., ... & Plaizier, J. C. (2022). *Saccharomyces cerevisiae* fermentation products reduce bacterial endotoxin concentrations and inflammation during grain-based subacute ruminal acidosis in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 105(3), 2354–2368. doi: 10.3168/jds.2021-20572
- Kaneko, J. J., Harvey, J. W., & Bruss, M. L. (2008). *Clinical biochemistry of domestic animals* (6th ed.). San Diego, CA: Academic Press.
- Mu, Y., Qi, W., Zhang, T., Zhang, J., & Mao, S. (2023). Coordinated response of milk bacterial and metabolic profiles to subacute ruminal acidosis in lactating dairy cows. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 14(1), 60.
- Murakami, Y., Tsukano, K., Hirata, H., & Suzuki, K. (2023). Evaluation of blood serum iron concentration as an alternative biomarker for inflammation in dairy cows. *Biological Trace Element Research*, 201(10), 4710–4717. doi: 10.1007/s12011-022-03544-5
- Nasrollahi, S. M. (2023). Challenges in the definition and measurement of subacute ruminal acidosis in Holstein dairy cows: A review. *Farm Animal Health and Nutrition*, 2(4), 63–70. doi: 10.58803/fahn.v2i4.32
- Nemeth, E., & Ganz, T. (2023). Hepcidin and iron in health and disease. *Annual Review of Medicine*, 74, 261–277. doi: 10.1146/annurev-med-043021-032816
- Neville, E. W., Fahey, A. G., Gath, V. P., Molloy, B. P., Taylor, S. J., & Mulligan, F. J. (2019). The effect of calcareous marine algae, with or without marine magnesium oxide, and sodium

bicarbonate on rumen pH and milk yield in mid lactation dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 102, 8027–8039. doi: 10.3168/jds.2019-16244

Neville, E. W., Fahey, A. G., & Meade, K. G., Mulligan, F. J. (2022). Effects of calcareous marine algae on milk yield, feed intake, energy balance, mineral status, and inflammatory markers in transition dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 105, 6616–6627. doi: 10.3168/jds.2021-21443

Nogueira, R. B., Marinho, R. C., Oliveira, E. C., Silva, A. E., Souza, R. C., & Menezes, G. L. (2021). [A new equation for predicting dry matter content in corn silage using air fryer]. *Sinapse Múltipla*, 10, 371–372.

O'Gorman, D. M., O'Carroll, C., & Carmody, R. J. (2012). Evidence that marine-derived, multi-mineral, Aquamin inhibits the NF- κ B signaling pathway *in vitro*. *Phytotherapy Research*, 26(4), 630–632. doi: 10.1002/ptr.3601

Pagani, A., Nai, A., Corna, G., Bosurgi, L., Rovere-Querini, P., Camaschella, C., & Silvestri, L. (2011). Low hepcidin accounts for the proinflammatory status associated with iron deficiency. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 118(3), 736–746. doi: 10.1182/blood-2011-02-337212

Plaizier, J., Krause, D., Gozho, G., & McBride, B. (2008). Subacute ruminal acidosis in dairy cows: the physiological causes, incidence and consequences. *Veterinary Journal*, 176, 21–31. doi: 10.1016/j.tvjl.2007.12.016

Plaizier, J. C., Danesh Mesgaran, M., Derakhshani, H., Golder, H., Khafipour, E., Kleen, J. L., et al. (2018). Review: Enhancing gastrointestinal health in dairy cows. *Animal*, 12, s399–s418. doi: 10.1017/S1751731118001921

Qasim, N. A. A. K., & Badawi, N. M. (2023). The haematological values and serum iron profile in dogs with some pathological and physiological conditions. *Journal of Survey in Fisheries Sciences*, 10(3S), 737–745.

Quiroz-Rocha, G. F., LeBlanc, S. J., Duffield, T. F., Wood, D., Leslie, K. E., & Jacobs, R. M. (2009). Reference limits for biochemical and hematological analytes of dairy cows one week before and one week after parturition. *Canadian Veterinary Journal*, 50, 383–388.

- Saco, Y., & Bassols, A. (2023). Acute phase proteins in cattle and swine: a review. *Veterinary Clinical Pathology*, 52, 50–63. doi: 10.1111/vcp.13220
- Sevgisunar, N. S., & Şahinduran, S. (2021). Evaluation of some acute phase proteins, cytokines and hepcidin levels in naturally infected Saanen goats with paratuberculosis. *MAKU Journal of Health Sciences Institute*, 9(3), 29–37. doi: 10.24998/maeusabed.996891
- Suega, K., & Widiana, G. R. (2019). Predicting hepcidin level using inflammation markers and iron indicators in patients with anemia of chronic disease. *Hematology, Transfusion and Cell Therapy*, 41, 342–348. doi: 10.1016/j.htct.2019.03.011
- Taha, N. M., Mandour, A. E. W. A., Lebda, M. A., Ghareeb, D. A., & Elkady, A. A. (2016). Bovine paraoxonase-1 activity in oxidative stress. *Alexandria Journal of Veterinary Sciences*, 51(2), 233-238. doi: 10.5455/ajvs.229270
- Thomas, F. C., Santana, A. M., Waterston, M., Haining, H., & Eckersall, P. D. (2016). Effect of pre-analytical treatments on bovine milk acute phase proteins. *BMC Veterinary Research*, 12, 1–7. doi: 10.1186/s12917-016-0769-6
- Tsukano, K., Shimamori, T., Fukuda, T., Nishi, Y., Otsuka, M., Kitade, Y., & Suzuki, K. (2019). Serum iron concentration as a marker of inflammation in young cows that underwent dehorning operation. *Journal of Veterinary Medical Science*, 81, 626–628. doi: 10.1292/jvms.19-0002
- Tsukano, K., Shimamori, T., & Suzuki, K. (2020). Serum iron concentration in cattle with endotoxaemia. *Acta Veterinaria Hungarica*, 68, 53–58. doi: 10.1556/004.2020.00016
- Voulgarakis, N., Gougoulis, D., Psalla, D., Papakonstantinou, G., Angelidou-Tsifida, M., Papatsiros, V., ... & Christodouloupoulos, G. (2023). Ruminal acidosis Part I: Clinical manifestations, epidemiology and impact of the disease. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 74(3), 5883–5891. doi: 10.12681/jhvms.31237
- Voulgarakis, N., Athanasiou, L. V., Psalla, D., Gougoulis, D., Papatsiros, V., & Christodouloupoulos, G. (2023). Review Ruminal Acidosis Part II: Diagnosis, Prevention and Treatment. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 74(4), 6489–6496. doi: 10.12681/jhvms.31438

Wysocka, D., Snarska, A., & Sobiech, P. (2020). Iron in cattle health. *Journal of Elementology*, 25(3), 1175–1185. doi: 10.5601/jelem.2020.25.2.1960

Zebeli, Q., Dunn, S. M., & Ametaj, B. N. (2010). Strong associations among rumen endotoxin and acute phase proteins with plasma minerals in lactating cows fed graded amounts of concentrate. *Journal of Animal Science*, 88(4), 1545–1553. doi: doi.org/10.2527/jas.2009-2203

Tabelas

Tabela 1. Ingredientes da ração total misturada (TMR), do concentrado e composição química da TMR basal das dietas experimentais.

Item	Tratamento ¹	
	CON	LITHO
Porcentagem de inclusão	%	
Forragem	46	46
Concentrado	54	54
Ingredientes da TMR	Kg/MS	
Silagem de milho	8,602	8,602
Pre-secado de azevém	3,139	3,139
Concentrado	13,916	13,916
Inclusão dos tratamentos	Kg/MS	
Bicarbonato de sódio	0,280	-
<i>Lithothamnium calcareum</i>	-	0,102
Ingredientes do Concentrado	%	
Farelo de arroz integral	12,65	12,65
Milho grão moído	38,75	38,75
Casca de soja	16,98	16,98
Farelo de soja	22,83	22,83
Soypass	5,09	5,09
Ureia Pecuária	0,82	0,82
Gordura Protegida	1,40	1,40
Mineral Premix	0,39	0,39
Sal comum	1,09	1,09
Análise química da TMR	%	
MS ²	46,47	46,47
MM ³	7,26	7,26
PB ⁴	16,76	16,76
EE ⁵	4,56	4,56
FDN ⁶	32,62	32,62
FDA ⁷	19,87	19,87
Amido	29,28	29,28
CNF ⁸	38,80	38,80

¹Tratamento: CON = Bicarbonato de Sódio; LITHO = *Lithothamnium calcareum*; ²MS = Matéria seca; ³MM = Matéria mineral; ⁴PB = Proteína Bruta; ⁵EE = Extrato etéreo; ⁶FDN = Fibra Detergente Neutro; ⁷FDA = Fibra Detergente Ácido; ⁸CNF = Carboidratos não fibrosos.

Tabela 2. pH ruminal e concentrações de Ferro e hepcidina sérica de vacas Holandesas alimentadas com dieta contendo 29,28% de amido, suplementadas com *Lithothamnium calcaireum* (LITHO) ou Bicarbonato de sódio (CON).

Parâmetros	Tratamento média±EP ¹			Valor de P	
	LITHO	CON	Grupo	Coleta	Grupo*coleta
pH ruminal	6.70 ± 0.11	6.80 ± 0.11	0.57	0.48	0.56
Ferro (µg/dL)	142.58±6.41	136.15±6.47	0.57	0,17	0,70
Hepcidina (ng/mL)	1.47±0.19	1.47±0.19	0.47	0,62	0,51

Tabela 3: Correlação de ferro e hepcidina com parâmetros metabólitos em vacas leiteiras em lactação suplementadas com *Lithothamnium calcareum*.

Parâmetro	Ferro		Hepcidina	
	P	R	P	r
PPT	0,75	-0,039	0,75	0,054
Albumina	0,04	0,243	0,57	0,094
Magnésio	0,07	0,221	0,87	0,028
Cálcio total	0,16	0,179	0,06	-0,328
Ureia	0,85	-0,023	0,33	0,162
Glicose	0,84	-0,023	0,02	-0,367
NEFA	0,85	-0,022	0,76	0,051
BHB	0,85	-0,023	0,17	0,219
PON-1	0,87	-0,020	0,04	0,347
Ferro	<0,01	1,000	0,34	-0,152
Hepcidina	0,34	-0,152	<0,01	1,000

Abreviações: Proteína Plasmática Total (PPT (g/dL), ácidos graxos não esterificados (NEFA (mmol/L), β -hidroxibutirato (BHB (mg/dL), paraoxonase 1 (PON-1).

Tabela 4: Correlação de ferro e hepcidina com parâmetros metabólitos em vacas leiteiras em lactação suplementadas com Bicarbonato de sódio.

Parâmetro	Ferro		Hepcidina	
	P	R	P	r
PPT	0,82	-0,287	0,67	0,074
Albumina	<0,01	0,356	0,72	0,058
Magnésio	0,24	0,146	0,48	0,118
Cálcio total	0,44	0,094	0,11	0,257
Ureia	0,02	0,279	0,87	-0,027
Glicose	0,58	-0,067	0,84	0,032
NEFA	0,17	-0,172	0,95	0,001
BHB	0,34	0,118	0,01	0,373
PON-1	0,88	0,019	0,34	0,170
Ferro	<0,01	1,000	0,28	0,173
Hepcidina	0,28	0,173	<0,01	1,000

Abreviações: Proteína Plasmática Total (PPT (g/dL), ácidos graxos não esterificados (NEFA (mmol/L), β -hidroxibutirato (BHB (mg/dL), paraoxonase 1 (PON-1).

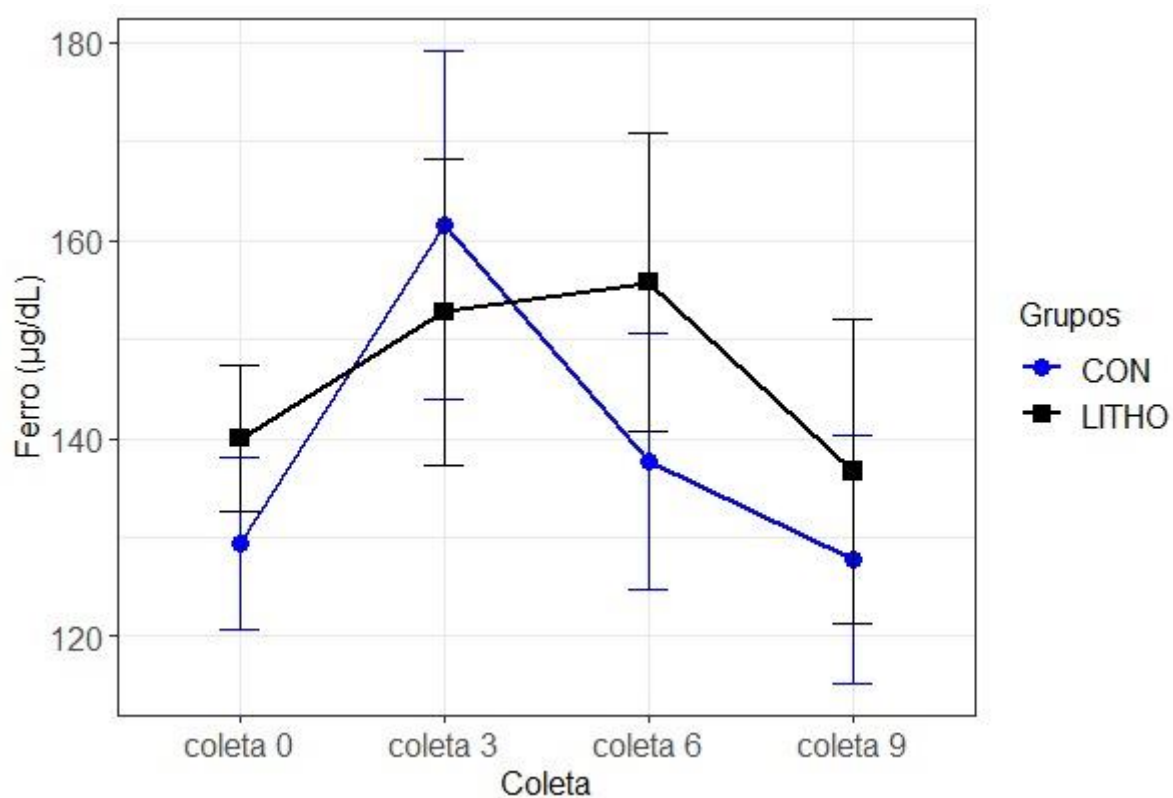
Figuras

Figura 1: Efeitos da suplementação com *Lithothamnium calcareum* (LITHO) e bicarbonato de sódio (CON) sobre os níveis séricos de ferro ao longo das coletas.

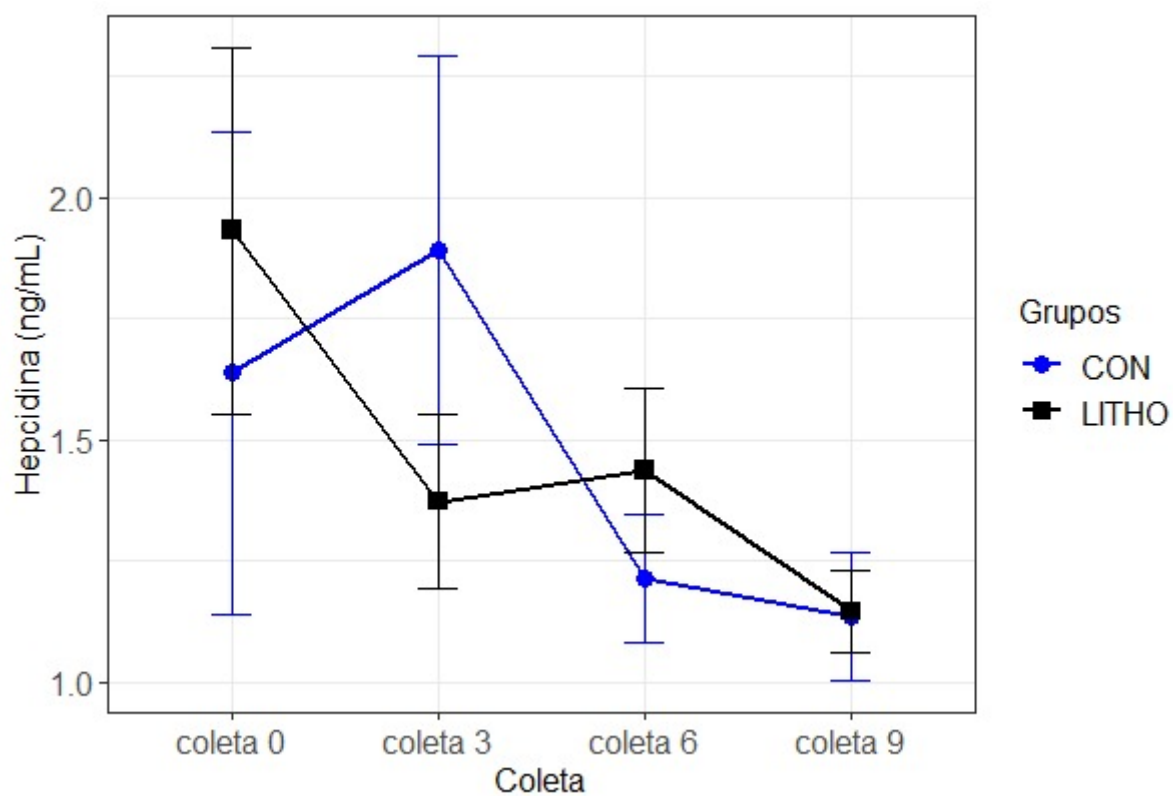


Figura 2: Efeitos da suplementação com *Lithothamnium calcareum* (LITHO) e bicarbonato de sódio (CON) sobre os níveis séricos de hepcidina ao longo das coletas.

5 Considerações Finais

O presente estudo investigou os efeitos da suplementação com *Lithothamnium calcareum* em vacas leiteiras alimentadas com dietas ricas em amido, com foco na estabilidade ruminal, resposta inflamatória sistêmica, desempenho produtivo e emissão estimada de metano entérico.

A suplementação com *Lithothamnium calcareum* demonstrou eficácia na manutenção da estabilidade do pH ruminal, com desempenho comparável ao do bicarbonato de sódio, tamponante convencionalmente utilizado. A inclusão de *Lithothamnium calcareum* não comprometeu a fermentação ruminal nem alterou significativamente os perfis de ácidos graxos voláteis, indicando preservação da saúde fermentativa mesmo em dietas altamente fermentáveis.

Em relação ao desempenho produtivo, embora não tenham sido observadas diferenças significativas no consumo de matéria seca entre os tratamentos, vacas suplementadas com *Lithothamnium calcareum* apresentaram maior produção de leite corrigida para gordura e energia, além de melhorias na composição do leite, com aumento dos teores de gordura e sólidos totais, refletindo em maior eficiência alimentar. Esses resultados indicam que o *Lithothamnium calcareum* pode substituir o bicarbonato de sódio sem prejuízo ao desempenho zootécnico.

Do ponto de vista da saúde sistêmica, os biomarcadores inflamatórios avaliados — ferro e hepcidina — indicaram ausência de inflamação significativa em vacas leiteiras desafiadas com uma dieta rica em amido, sugerindo que a integridade da mucosa ruminal foi preservada sob ambas as estratégias de tamponamento.

Apesar de suas propriedades como tamponante natural e fonte mineral de alta biodisponibilidade, os efeitos antimetanogênicos de *Lithothamnium calcareum* foram limitados neste estudo. A ausência de alterações significativas na produção estimada de metano e na relação acetato:propionato indica que o aditivo, isoladamente, pode não ser suficiente para mitigar a metanogênese entérica de forma expressiva. Dessa forma, seu uso deve ser considerado dentro de uma abordagem nutricional mais ampla, possivelmente em combinação com outros aditivos com ação direta sobre a microbiota ruminal.

Conclui-se, portanto, que *Lithothamnium calcareum* é uma opção promissora como aditivo tamponante natural em dietas de alta fermentação, promovendo estabilidade ruminal, desempenho produtivo adequado e manutenção da saúde sistêmica. No entanto, seu potencial como agente antimetanogênico permanece incerto, sendo recomendada a realização de novos estudos que explorem diferentes níveis de inclusão, interações com outros aditivos e a utilização de metodologias diretas de mensuração do metano entérico

Referências

ABOAGYE, I. A.; BEAUCHEMIN, K. A. Potential of molecular weight and structure of tannins to reduce methane emissions from ruminants: A review. *Animals*, v. 9, n. 11, p. 856, 2019.

ALLEN, M. S. Relationship between fermentation acid production in the rumen and the requirement for physically effective fiber. *Journal of Dairy Science*, v. 80, n. 7, p. 1447-1462, 1997.

ANDERSEN, J. B.; SEHESTED, J.; INGVARTSEN, K. L. Effect of dry cow feeding strategy on rumen pH, concentration of volatile fatty acids and rumen epithelium development. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A - Animal Science*, v. 49, n. 3, p. 149-155, 1999.

ANTANAITIS, R.; DŽERMEIKAITĖ, K.; KRIŠTOLAITYTĖ, J.; STANKEVIČIUS, R.; DAUNORAS, G.; TELEVIČIUS, M.; VIORA, L. Changes in parameters registered by innovative technologies in cows with subclinical acidosis. *Animals*, [S.l.], v. 14, n. 13, p. 1883, 2024.

ARCE-CORDERO, J. A.; LIU, T.; RAVELO, A.; LOBO, R. R.; AGUSTINHO, B. C.; MONTEIRO, H. F.; FACIOLA, A. P. Effects of calcium-magnesium carbonate and calcium-magnesium hydroxide as supplemental sources of magnesium on ruminal microbiome. *Translational Animal Science*, v. 6, n. 3, p. txac092, 2022.

ASCHENBACH, J. R.; GÄBEL, G. Effect and absorption of histamine in sheep rumen: Significance of acidotic epithelial damage. *Journal of Animal Science*, v. 78, n. 2, p. 464-470, 2000.

ASCHENBACH, J. R.; KRISTENSEN, N. B.; DONKIN, S. S.; HAMMON, H. M.; PENNER, G. B. Gluconeogenesis in dairy cows: the secret of making sweet milk from sour dough. *IUBMB Life*, v. 62, n. 12, p. 869-877, 2010.

ASCHENBACH, J. R.; PENNER, G. B.; STUMPF, F.; GÄBEL, G. Ruminant nutrition symposium: role of fermentation acid absorption in the regulation of ruminal pH. *Journal of Animal Science*, v. 89, n. 4, p. 1092-1107, 2011.

BALDWIN, R. L.; ALLISON, M. J. Rumen metabolism. *Journal of Animal Science*, v. 57, suppl. 2, p. 461-477, 1983.

BEAUCHEMIN, K. A. Invited review: current perspectives on eating and rumination activity in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 101, p. 4762–4784, 2018.

BEAUCHEMIN, K. A.; KREUZER, M.; O'MARA, F.; MCALLISTER, T. A. Nutritional management for enteric methane abatement: a review. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, v. 48, n. 2, p. 21-27, 2008.

BEHLKE, E. J. Attenuation of ruminal methanogenesis. *Theses and Dissertations in Animal Science*, n. 3, 2007.

BERGHUIS, B. A.; YU, F. B.; SCHULZ, F.; BLAINEY, P. C.; WOYKE, T.; QUAKE, S. R. Hydrogenotrophic methanogenesis in archaeal phylum Verstraetearchaeota reveals the shared ancestry of all methanogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 116, n. 11, p. 5037-5044, 2019.

BERNARD, J. K.; WEST, J. W.; MULLIS, N.; WU, Z.; TAYLOR, S. J. Evaluation of calcareous marine algae supplements on production and metabolic parameters of early lactation dairy cows. *The Professional Animal Scientist*, v. 30, n. 6, p. 649-656, 2014.

BRADFORD, B. J.; YUAN, K.; FARNEY, J. K.; MAMEDOVA, L. K.; CARPENTER, A. J. Invited review: Inflammation during the transition to lactation: New adventures with an old flame. *Journal of Dairy Science*, v. 98, n. 10, p. 6631-6650, 2015.

BRAMLEY, E.; LEAN, I. J.; FULKERSON, W. J.; STEVENSON, M. A.; RABIEE, A. R.; COSTA, N. D. The definition of acidosis in dairy herds predominantly fed on pasture and concentrates. *Journal of Dairy Science*, v. 91, n. 1, p. 308-321, 2008.

BRENT, B. E. Relationship of acidosis to other feedlot ailments. *Journal of Animal Science*, v. 43, n. 4, p. 930-935, 1976.

BRESTOFF, J. R.; ARTIS, D. Commensal bacteria at the interface of host metabolism and the immune system. *Nature Immunology*, v. 14, n. 7, p. 676-684, 2013.

BROUČEK, J. Options to methane production abatement in ruminants: a review. *Animals*, 2018, p. 348-364. CALITZ, T. The effect of acid buf and combinations of acid buf and socium bicarbonate in dairy cow diets on production response and rumen parameters. 2009. Tese (Doutorado) — University of Stellenbosch, Stellenbosch, 2009.

CALSAMIGLIA, S.; BUSQUET, M.; CARDOZO, P. W.; CASTILLEJOS, L.; FERRET, A. Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*, v. 90, n. 6, p. 2580-2595, 2007.

CASTILLO-GONZÁLEZ, A. R.; BURROLA-BARRAZA, M. E.; DOMÍNGUEZ-VIVEROS, J.; CHAVEZ-MARTINEZ, A. R. Rumen microorganisms and fermentation. *Archivos de Medicina Veterinaria*, v. 46, n. 3, p. 349-361, 2014.

CHAUDHRY, A. S.; KHAN, M. A.; KHAN, M. S.; ASHRAF, K.; SALEEM, M. H.; KHAN, N. U.; AHMAD, I. Effect of different level of concentrate feeding on hematobiochemical parameters in an experimentally induced sub acute ruminal acidosis (SARA) in sheep and its management with different concentration of antacids. *JAPS: Journal of Animal & Plant Sciences*, v. 28, n. 1, 2018.

CHOUDHURY, P. K.; SALEM, A. Z. M.; JENA, R.; KUMAR, S.; SINGH, R.; PUNIYA, A. K. Rumen microbiology: An overview. In: *Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution*, p. 3-16, 2015.

CRUYWAGEN, C. W.; TAYLOR, S.; BEYA, M. M.; CALITZ, T. The effect of buffering dairy cow diets with limestone, calcareous marine algae, or sodium bicarbonate on ruminal pH profiles, production responses, and rumen fermentation. *Journal of Dairy Science*, v. 98, p. 5506–5514, 2015.

DANIELSSON, R.; DICKSVED, J.; SUN, L.; GONDA, H.; MÜLLER, B.; SCHNÜRER, A.; BERTILSSON, J. Methane production in dairy cows correlates with rumen methanogenic and bacterial community structure. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, p. 226, 2017.

DANSCHER, A. M.; LI, S.; ANDERSEN, P. H.; KHAFIPOUR, E.; KRISTENSEN, N. B.; PLAIZIER, J. C. Indicators of induced subacute ruminal acidosis (SARA) in Danish Holstein cows. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 57, p. 1-14, 2015.

DE BHOWMICK, G.; HAYES, M. Potential of seaweeds to mitigate production of greenhouse gases during production of ruminant proteins. *Global Challenges*, v. 7, n. 5, p. 2200145, 2023.

DENNINGER, T. M.; SCHWARM, A.; BIRKINSHAW, A.; TERRANOVA, M.; DOHME-MEIER, F.; MUENGER, A.; ... KREUZER, M. Immediate effect of *Acacia mearnsii* tannins on methane emissions and milk fatty acid profiles of dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*, v. 261, p. 114388, 2020.

DENWOOD, M. J.; KLEEN, J. L.; JENSEN, D. B.; JONSSON, N. N. Describing temporal variation in reticuloruminal pH using continuous monitoring data. *Journal of Dairy Science*, v. 101, n. 1, p. 233-245, 2018.

DE VOS, C. Effect of feed additive supplementation on rumen bacterial amino acid profile and fermentation dynamics in dairy cows. Dissertação (Mestrado) — University of Pretoria (South Africa), 2019.

DEVRIES, T. J.; DOHME, F.; BEAUCHEMIN, K. A. Repeated ruminal acidosis challenges in lactating dairy cows at high and low risk for developing acidosis: Feed sorting. *Journal of Dairy Science*, v. 91, n. 10, p. 3958-3967, 2008.

DEVRIES, T. J.; SCHWAIGER, T.; BEAUCHEMIN, K. A.; PENNER, G. B. The duration of time that beef cattle are fed a high-grain diet affects feed sorting behavior both before and after acute ruminal acidosis. *Journal of Animal Science*, v. 92, n. 4, p. 1728-1737, 2014.

DIJKSTRA, J.; ELLIS, J. L.; KEBREAB, E.; STRATHE, A. B.; LÓPEZ, S.; FRANCE, J.; BANNINK, A. Ruminal pH regulation and nutritional consequences of low pH. *Animal Feed Science and Technology*, v. 172, n. 1-2, p. 22-33, 2012.

DIRKSEN, G. A.T. Phillipsoon's physiology in Ruminants. P-612. Oriel Press, U.K., 1970.

DIRKSEN, G. The rumen acidosis complex--recent knowledge and experiences (1). *Tierärztliche Praxis*, v. 13, n. 4, p. 501-512, 1985.

DUBOIS, B.; TOMKINS, N. W.; KINLEY, R. D.; BAI, M.; SEYMOUR, S.; PAUL, N. A.; DE NYS, R. Effect of tropical algae as additives on rumen in vitro gas production and fermentation characteristics. *American Journal of Plant Sciences*, v. 4, n. 12B, p. 34-43, 2013.

DUTERTRE, M.; GRALL, J.; EHRHOLD, A.; HAMON, D. Environmental factors affecting maerl bed structure in Brittany (France). *European Journal of Phycology*, v. 50, n. 4, p. 371–383, 2015.

ELMHADI, M. E.; ALI, D. K.; KHOGALI, M. K.; WANG, H. Subacute ruminal acidosis in dairy herds: Microbiological and nutritional causes, consequences, and prevention strategies. *Animal Nutrition*, v. 10, p. 148-155, 2022.

EMMANUEL, D. G. V.; DUNN, S. M.; AMETAJ, B. N. Feeding high proportions of barley grain stimulates an inflammatory response in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 91, n. 2, p. 606-614, 2008.

ENEMARK, J. M. The monitoring, prevention and treatment of sub-acute ruminal acidosis (SARA): A review. *The Veterinary Journal*, v. 176, n. 1, p. 32-43, 2008.

ERDMAN, R. A. Dietary buffering requirements of the lactating dairy cow: a review. *Journal of Dairy Science*, v. 71, p. 3246–3266, 1988.

ERDMAN, R. A.; HEMKEN, R. W.; BULL, L. S. Dietary sodium bicarbonate and magnesium oxide for early postpartum lactating dairy cows: effects of production, acid-based metabolism, and digestion. *Journal of Dairy Science*, v. 65, n. 5, p. 712-731, 1982.

EVCI, Ş. Digestion and importance of starch in ruminants. *Turkish Journal of Veterinary Research*, v. 8, n. 2, p. 143-150, 2024.

FOGGI, G.; TERRANOVA, M.; DAGHIO, M.; AMELCHANKA, S. L.; CONTE, G.; INEICHEN, S.; ... MELE, M. Evaluation of ruminal methane and ammonia formation and microbiota composition as affected by supplements based on mixtures of tannins

and essential oils using Rusitec. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, v. 15, n. 1, p. 48, 2024.

FIRKINS, J. L.; EASTRIDGE, M. L.; ST-PIERRE, N. R.; NOFTSGER, S. M. Effects of grain variability and processing on starch utilization by lactating dairy cattle. *Journal of Animal Science*, v. 79, suppl. E, p. E218-E238, 2001.

FU, Y.; HE, Y.; XIANG, K.; ZHAO, C.; HE, Z.; QIU, M.; ZHANG, N. The role of rumen microbiota and its metabolites in subacute ruminal acidosis (SARA)-induced inflammatory diseases of ruminants. *Microorganisms*, v. 10, n. 8, p. 1495, 2022.

GAO, X.; OBA, M. Characteristics of dairy cows with a greater or lower risk of subacute ruminal acidosis: Volatile fatty acid absorption, rumen digestion, and expression of genes in rumen epithelial cells. *Journal of Dairy Science*, v. 99, n. 11, p. 8733-8745, 2016.

GANZ, T.; NEMETH, E. Hepcidin and iron homeostasis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, v. 1823, n. 9, p. 1434-1443, 2012.

GARRETT, E. F.; PEREIRA, M. N.; NORDLUND, K. V.; ARMENTANO, L. E.; GOODGER, W. J.; OETZEL, G. R. Diagnostic methods for the detection of subacute ruminal acidosis in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 82, n. 6, p. 1170-1178, 1999.

GESSNER, D. K.; BROCK, C.; HOF, L. M.; MOST, E.; KOCH, C.; EDER, K. Effects of supplementation of green tea extract on the milk performance of periparturient dairy cows and the expression of stress response genes in the liver. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, v. 11, p. 1-12, 2020.

GOEL, G.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Changes in microbial community structure, methanogenesis and rumen fermentation in response to saponin-rich fractions from different plant materials. *Journal of Applied Microbiology*, v. 105, n. 3, p. 770-777, 2008.

GOLDER, H. M.; DENMAN, S. E.; McSWEENEY, C.; WALES, W. J.; AULDIST, M. J.; WRIGHT, M. M.; LEAN, I. J. Effects of partial mixed rations and supplement amounts

on milk production and composition, ruminal fermentation, bacterial communities, and ruminal acidosis. *Journal of Dairy Science*, v. 97, n. 9, p. 5763-5785, 2014.

GOLDER, H. M.; REHBERGER, J.; SMITH, A. H.; BLOCK, E.; LEAN, I. J. Ruminal bacterial communities differ in early-lactation dairy cows with differing risk of ruminal acidosis. *Frontiers in Microbiomes*, v. 2, p. 1212255, 2023.

GOLDER, H. M.; LEAN, I. J. Ruminal acidosis and its definition: A critical review. *Journal of Dairy Science*, v. 107, n. 12, p. 10066–10098, 2024.

GOLDER, P. N.; MITRA, D.; MOORMAN, C. What is quality? An integrative framework of processes and states. *Journal of Marketing*, v. 76, n. 4, p. 1-23, 2012.

GONZALEZ, F. H. D.; RUIPEREZ, F. H.; SÁNCHEZ, J. M.; SOUZA, J. C.; MARTINEZ-SUBIELA, S.; CERÓN, J. J. Haptoglobin and serum amyloid A in subacute ruminal acidosis in goats. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, v. 57, n. 3, p. 159-167, 2010.

GOTHO, Y.; KIYONO, H. Epithelial barrier: an interface for the cross-communication between gut flora and immune system. *Immunological Reviews*, v. 245, n. 1, p. 147-163, 2012.

GOTT, P. N.; HOGAN, J. S.; WEISS, W. P. Effects of various starch feeding regimens on responses of dairy cows to intramammary lipopolysaccharide infusion. *Journal of Dairy Science*, v. 98, n. 3, p. 1786-1796, 2015.

GOZHO, G. N.; KRAUSE, D. O.; PLAIZIER, J. C. Ruminal lipopolysaccharide concentration and inflammatory response during grain-induced subacute ruminal acidosis in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 90, n. 2, p. 856-866, 2007.

GOZHO, G. N.; PLAIZIER, J. C.; KRAUSE, D. O.; KENNEDY, A. D.; WITTENBERG, K. M. Subacute ruminal acidosis induces ruminal lipopolysaccharide endotoxin release and triggers an inflammatory response. *Journal of Dairy Science*, v. 88, n. 4, p. 1399-1403, 2005.

GRIINARI, J. M.; BAUMAN, D. E. Milk fat depression: concepts, mechanisms and management applications. In: Ruminant Physiology. Wageningen Academic, 2006. p. 389-417.

GUERREIRO, P.; COSTA, D. F.; LIMEDE, A. C.; CONGIO, G. F.; MESCHIATTI, M. A.; BERNARDES, P. A.; SANTOS, F. A. P. Effects of Monensin, Calcareous Algae, and Essential Oils on Performance, Carcass Traits, and Methane Emissions Across Different Breeds of Feedlot-Finished Beef Cattle. *Ruminants*, v. 5, n. 1, p. 2, 2025.

GUO, C.; SUN, D.; WANG, X.; MAO, S. Um estudo metabolômico e proteômico combinado revelou a diferença nos perfis de expressão de metabólitos e proteínas no tecido ruminal de cabras alimentadas com feno ou dietas ricas em grãos. *Frontiers in Physiology*, v. 10, p. 66, 2019.

HALL-SPENCER, J. M.; KELLY, J.; MAGGS, C. A. Bivalve fishing and maerl-bed conservation in France and the UK – retrospect and prospect. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, v. 13, supl. 1, p. S33–S41, 2003.

HAJIKOLAEI, M. H.; NOURI, M.; AFSHAR, F. S.; DEHKORDI, A. J. Effects of experimentally induced ruminal lactic acidosis on blood pH, bicarbonate and pCO₂ in the sheep. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, v. 9, n. 10, p. 2003-2005, 2006.

HENNING, P. H.; HORN, C. H.; STEYN, D. G.; MEISSNER, H. H.; HAGG, F. M. The potential of *Megasphaera elsdenii* isolates to control ruminal acidosis. *Animal Feed Science and Technology*, v. 157, n. 1-2, p. 13-19, 2010.

HERNÁNDEZ, J.; BENEDITO, J. L.; ABUELO, A.; CASTILLO, C. Ruminal acidosis in feedlot: from aetiology to prevention. *The Scientific World Journal*, v. 2014, p. 702572, 2014.

HILL, J.; MCSWEENEY, C.; WRIGHT, A. D. G.; BISHOP-HURLEY, G.; KALANTAR-ZADEH, K. Measuring methane production from ruminants. *Trends in Biotechnology*, v. 34, n. 1, p. 26-35, 2016.

HUA, C.; TIAN, J.; TIAN, P.; CONG, R.; LUO, Y.; GENG, Y.; ZHAO, R. Feeding a high concentration diet induces unhealthy alterations in the composition and metabolism of

ruminal microbiota and host response in a goat model. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, p. 138, 2017.

HUHTANEN, P.; CABEZAS-GARCIA, E. H.; UTSUMI, S.; ZIMMERMAN, S. Comparison of methods to determine methane emissions from dairy cows in farm conditions. *Journal of Dairy Science*, v. 98, n. 5, p. 3394-3409, 2015.

HUMER, E.; GHAREEB, K.; HARDER, H.; MICKDAM, E.; KHOL-PARISINI, A.; ZEBELI, Q. Peripartal changes in reticuloruminal pH and temperature in dairy cows differing in the susceptibility to subacute rumen acidosis. *Journal of Dairy Science*, v. 98, n. 12, p. 8788-8799, 2015.

HUMER, E.; PETRI, R. M.; ASCHENBACH, J. R.; BRADFORD, B. J.; PENNER, G. B.; TAJAJ, M.; ZEBELI, Q. Invited review: Practical feeding management recommendations to mitigate the risk of subacute ruminal acidosis in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, v. 101, n. 2, p. 872-888, 2018.

HOU, G.; WANG, J.; LIU, S.; GAO, D.; XU, Y.; ZHUANG, Y.; CAO, Z. Integrating Subacute Ruminant Acidosis, Lipopolysaccharide, and Trained Immunity: A Comprehensive Review. *International Journal of Biological Sciences*, v. 21, n. 6, p. 2806, 2025.

HUOT, F.; CLAVEAU, S.; BUNEL, A.; SANTACHI, D. E.; GERVAIS, R.; PAQUET, É. R. Relationship between farm management strategies, reticuloruminal pH variations, and risks of subacute ruminal acidosis. *Journal of Dairy Science*, v. 106, n. 4, p. 2487-2497, 2023.

ISHAQ, S. L.; ALZAHAL, O.; WALKER, N.; MCBRIDE, B. An investigation into rumen fungal and protozoal diversity in three rumen fractions, during high-fiber or grain-induced sub-acute ruminal acidosis conditions, with or without active dry yeast supplementation. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, p. 1943, 2017.

ISLAM, M.; LEE, S. S. Advanced estimation and mitigation strategies: a cumulative approach to enteric methane abatement from ruminants. *Journal of Animal Science and Technology*, v. 61, n. 3, p. 122, 2019.

JARAMILLO-LÓPEZ, E.; ITZA-ORTIZ, M. F.; PERAZA-MERCADO, G.; CARRERA-CHÁVEZ, J. M. Ruminal acidosis: strategies for its control. *Austral Journal of Veterinary Sciences*, v. 49, n. 3, p. 139-148, 2017.

JOHNSON, K. A.; KINCAID, R. L.; WESTBERG, H. H.; GASKINS, C. T.; LAMB, B. K.; CRONRATH, J. D. The effect of oilseeds in diets of lactating cows on milk production and methane emissions. *Journal of Dairy Science*, v. 85, n. 6, p. 1509-1515, 2002.

JONSSON, N. N.; KLEEN, J. L.; WALLACE, R. J.; ANDONOVIC, I.; MICHIE, C.; FARISH, M.; DENWOOD, M. J. Evaluation of reticuloruminal pH measurements from individual cattle: sampling strategies for the assessment of herd status. *The Veterinary Journal*, v. 243, p. 26-32, 2019.

KACHHADIA, L. V.; KATOLE, S. B.; PANDYA, P. R.; SORATHIYA, K. K. Effect of feeding various sources of zinc on nutrient digestibility and rumen parameters of male crossbred calves. *Indian Journal of Animal Nutrition*, v. 40, n. 1, p. 16-22, 2023.

KERTZ, A. F.; REUTZEL, L. F.; MAHONEY, J. H. Ad libitum water intake by neonatal calves and its relationship to calf starter intake, weight gain, feces score, and season. *Journal of Dairy Science*, v. 67, n. 12, p. 2964-2969, 1984.

KHAFIPOUR, E.; LI, S.; PLAIZIER, J. C.; KRAUSE, D. O. Rumen microbiome composition determined using two nutritional models of subacute ruminal acidosis. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 75, n. 22, p. 7115-7124, 2009.

KHAFIPOUR, E.; KRAUSE, D. O.; PLAIZIER, J. C. Alfalfa pellet-induced subacute ruminal acidosis in dairy cows increases bacterial endotoxin in the rumen without causing inflammation. *Journal of Dairy Science*, v. 92, n. 4, p. 1712-1724, 2009.

KHAFIPOUR, E.; LI, S.; TUN, H. M.; DERAKHSHANI, H.; MOOSSAVI, S.; PLAIZIER, J. C. Effects of grain feeding on microbiota in the digestive tract of cattle. *Animal Frontiers*, v. 6, n. 2, p. 13-19, 2016.

KLEEN, J. L.; HOOIJER, G. A.; REHAGE, J.; NOORDHUIZEN, J. P. T. M. Subacute ruminal acidosis (SARA): a review. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, v. 50, n. 8, p. 406-414, 2003.

KINLEY, R. D.; MARTINEZ-FERNANDEZ, G.; MATTHEWS, M. K.; DE NYS, R.; MAGNUSSON, M.; TOMKINS, N. W. Mitigating the carbon footprint and improving productivity of ruminant livestock agriculture using a red seaweed. *Journal of Cleaner Production*, v. 259, p. 120836, 2020.

KOBAYASHI, Y. Abatement of methane production from ruminants: trends in the manipulation of rumen fermentation. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, v. 23, n. 3, p. 410-416, 2010.

KOZLOSKI, G. V. *Bioquímica dos ruminantes*. Santa Maria: Ed. UFSM, 2002.

KRAUSE, K. M.; OETZEL, G. R. Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: a review. *Animal Feed Science and Technology*, v. 126, n. 3-4, p. 215-236, 2006.

KRÓLICZEWSKA, B.; PECKA-KIEŁB, E.; BUJOK, J. Strategies used to reduce methane emissions from ruminants: controversies and issues. *Agriculture*, v. 13, n. 3, p. 602, 2023.

LAN, W.; YANG, C. Ruminal methane production: Associated microorganisms and the potential of applying hydrogen-utilizing bacteria for mitigation. *Science of the Total Environment*, v. 654, p. 1270-1283, 2019.

LASKOSKI, L. M.; MURARO, L. S.; SANTANA JÚNIOR, M. S.; CARVALHO, M. B.; FREITAS, S. H.; DÓRIA, R. G.; DITTRICH, R. L. Sodium bicarbonate as prevention of metabolic acidosis in sheep submitted to experimental ruminal acidosis. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 34, p. 822-826, 2014.

LETTAT, A.; NOZIERE, P.; SILBERBERG, M.; MORGAVI, D. P.; BERGER, C.; MARTIN, C. Experimental feed induction of ruminal lactic, propionic, or butyric acidosis in sheep. *Journal of Animal Science*, v. 88, n. 9, p. 3041-3046, 2010.

LI, S.; GOZHO, G. N.; GAKHAR, N.; KHAFIPOUR, E.; KRAUSE, D. O.; PLAIZIER, J. C. Evaluation of diagnostic measures for subacute ruminal acidosis in dairy cows. *Canadian Journal of Animal Science*, v. 92, n. 3, p. 353-364, 2012.

LIMA, L. G. F.; TARGUETA, C. P.; NUNES, R.; DE PAULA, R. S.; APOLINÁRIO, A. M.; ARNHOLD, E.; ... FERREIRA, R. N. Ruminal microbiome and blood parameters in beef cattle fed with high-grain diets buffered with *Lithothamnium calcareum*. *Animal Production Science*, v. 64, n. 1, 2023.

LIU, Y.; ZHOU, M.; DIAO, Q.; MA, T.; TU, Y. Seaweed as a feed additive to mitigate enteric methane emissions in ruminants: Opportunities and challenges. *Journal of Integrative Agriculture*, v. 24, n. 4, p. 1327-1341, 2025.

LOUČKA, R.; JAMBOR, V.; SYNKOVÁ, H.; HOMOLKA, P.; KUMPRECHTOVÁ, D.; KOUKOLOVÁ, V.; ... e JANČÍK, F.. Effect of Calcareous Marine Algae Buffer on High-Producing Dairy Cows during Peak Lactation. **Animals*, 14(6), 897, 2024.

MA, J.; SHAH, A. M.; WANG, Z.; FAN, X. Potential protective effects of thiamine supplementation on the ruminal epithelium damage during subacute ruminal acidosis. *Animal Science Journal*, v. 92, n. 1, p. e13579, 2021.

MAEKAWA, M.; BEAUCHEMIN, K. A.; CHRISTENSEN, D. A. Chewing activity, saliva production, and ruminal pH of primiparous and multiparous lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 85, n. 5, p. 1176-1182, 2002.

MACHADO, L.; MAGNUSSON, M.; PAUL, N. A.; DE NYS, R.; TOMKINS, N. Effects of marine and freshwater macroalgae on in vitro total gas and methane production. *PLoS One*, v. 9, n. 1, e85289, 2014.

MACHADO, L.; MAGNUSSON, M.; PAUL, N. A.; KINLEY, R.; DE NYS, R.; TOMKINS, N. Dose-response effects of *Asparagopsis taxiformis* and *Oedogonium* sp. on in vitro fermentation and methane production. *Journal of Applied Phycology*, v. 28, p. 1443-1452, 2016.

MACKIE, R. I.; GILCHRIST, F. M. Changes in lactate-producing and lactate-utilizing bacteria in relation to pH in the rumen of sheep during stepwise adaptation to a high-concentrate diet. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 38, n. 3, p. 422-430, 1979.

MAO, S. Y.; HUO, W. J.; ZHU, W. Y. Microbiome–metabolome analysis reveals unhealthy alterations in the composition and metabolism of ruminal microbiota with

increasing dietary grain in a goat model. *Environmental Microbiology*, v. 18, n. 2, p. 525-541, 2016.

MARTINEZ-FERNANDEZ, G.; DENMAN, S. E.; CHEUNG, J.; MCSWEENEY, C. S. Phloroglucinol degradation in the rumen promotes the capture of excess hydrogen generated from methanogenesis inhibition. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, p. 1871, 2017.

MAWDAE, E.; DARIEN, K. A.; MAWAHIB, K. K.; HONGRONG, W. Subacute ruminal acidosis in dairy herds: microbiological and nutritional causes, consequences, and prevention strategies. *Animal Nutrition*, v. 10, p. 148–155, 2022.

MENSCHING, A.; ZSCHIESCHE, M.; HUMMEL, J.; GRELET, C.; GENGLER, N.; DÄNICKE, S.; SHARIFI, A. R. Development of a subacute ruminal acidosis risk score and its prediction using milk mid-infrared spectra in early-lactation cows. *Journal of Dairy Science*, v. 104, n. 4, p. 4615-4634, 2021.

MCALLISTER, T. A.; CHENG, K. J.; OKINE, E. K.; MATHISON, G. W. Dietary, environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. *Canadian Journal of Animal Science*, v. 76, n. 2, p. 231-243, 1996.

MCALLISTER, T. A.; NEWBOLD, C. J. Redirecting rumen fermentation to reduce methanogenesis. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, v. 48, n. 2, p. 7-13, 2008.

MICKDAM, E.; KHIAOSA-ARD, R.; METZLER-ZEBELI, B. U.; KLEVENHUSEN, F.; CHIZZOLA, R.; ZEBELI, Q. Rumen microbial abundance and fermentation profile during severe subacute ruminal acidosis and its modulation by plant derived alkaloids in vitro. *Anaerobe*, v. 39, p. 4-13, 2016.

MCCAULEY, J. I.; LABEEUW, L.; JARAMILLO-MADRID, A. C.; NGUYEN, L. N.; NGHIEM, L. D.; CHAVES, A. V.; RALPH, P. J. Management of enteric methanogenesis in ruminants by algal-derived feed additives. *Current Pollution Reports*, v. 6, p. 188-205, 2020.

MILLEN, D. D.; PACHECO, R. D. L.; DA SILVA CABRAL, L.; CURSINO, L. L.; WATANABE, D. H. M.; RIGUEIRO, A. L. N. Ruminal acidosis. *Rumenology*, p. 127-156, 2016.

MONTEIRO, H. F.; FACIOLA, A. P. Ruminal acidosis, bacterial changes, and lipopolysaccharides. *Journal of Animal Science*, v. 98, n. 8, p. skaa248, 2020.

MORGANTE, M.; STELLETTA, C.; BERZAGHI, P.; GIANESELLA, M.; ANDRIGHETTO, I. Subacute rumen acidosis in lactating cows: an investigation in intensive Italian dairy herds. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, v. 91, n. 5-6, p. 226-234, 2007.

MORGAVI, D. P.; FORANO, E.; MARTIN, C.; NEWBOLD, C. J. Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Animal*, v. 4, n. 7, p. 1024-1036, 2010.

NAGARAJA, T. G.; TITGEMEYER, E. C. Ruminal acidosis in beef cattle: the current microbiological and nutritional outlook. *Journal of Dairy Science*, v. 90, p. E17-E38, 2007.

NEIDERFER, K. P.; BARNARD, A. M.; MOYER, K. Z.; TRENCH, A. M.; TAYLOR, A. E.; CRONIN, S. K.; GRESSLEY, T. F. Effects of calcium carbonate, magnesium oxide and encapsulated sodium bicarbonate on measures of post-ruminal fermentation. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, v. 104, n. 3, p. 802-811, 2020.

NEGUSSIE, E.; LEHTINEN, J.; MÄNTYSAARI, P.; BAYAT, A. R.; LIINAMO, A. E.; MÄNTYSAARI, E. A.; LIDAUER, M. H. Non-invasive individual methane measurement in dairy cows. *Animal*, v. 11, n. 5, p. 890-899, 2017.

NEVILLE, E. W.; FAHEY, A. G.; GATH, V. P.; MOLLOY, B. P.; TAYLOR, S. J.; MULLIGAN, F. J. The effect of calcareous marine algae, with or without marine magnesium oxide, and sodium bicarbonate on rumen pH and milk yield in mid lactation dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 102, p. 8027–8039, 2019.

NEVILLE, E. W.; FAHEYF, A. G.; MEADE, K. G.; MULLIGAN, F. J. Effects of calcareous marine algae on milk yield, feed intake, energy balance, mineral status, and inflammatory markers in transition dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 105, p. 6616–6627, 2022.

NORDLUND, K. V.; GARRETT, E. F.; OETZEL, G. R. Herd-based rumenocentesis: a clinical approach to the diagnosis of subacute rumen acidosis, 1995.

NIKVAND, A. A.; NOURI, M.; JALALI, M. R.; AZADBAKHT, M. R. T. Effects of activated charcoal and zeolite on serum lipopolysaccharides and some inflammatory biomarkers levels in experimentally induced subacute ruminal acidosis in lambs. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, v. 44, n. 4, p. 830-837, 2020.

OETZEL, G. R. Clinical aspects of ruminal acidosis in dairy cattle. In: *American Association of Bovine Practitioners Conference Proceedings*, 2000. p. 46-53.

OETZEL, G. R. Diagnosis and management of subacute ruminal acidosis in dairy herds. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, v. 33, n. 3, p. 463-480, 2017.

OWENS, F. N.; SECRIST, D. S.; HILL, W. J.; GILL, D. R. Acidosis in cattle: a review. *Journal of Animal Science*, v. 76, n. 1, p. 275-286, 1998.

PATRA, R. C.; LAL, S. B.; SWARUP, D. Physicochemical alterations in blood, cerebrospinal fluid and urine in experimental lactic acidosis in sheep. *Research in Veterinary Science*, v. 54, n. 2, p. 217-220, 1993.

PEREIRA, R. L. G.; MACHADO, F. S.; CAMPOS, M. M.; GUIMARAES JÚNIOR, R.; TOMICH, T. R.; REIS, L. G.; COOMBS, C. Enteric methane mitigation strategies in ruminants: a review. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, v. 28, n. 2, p. 124-143, 2015.

PEREZ, H. G.; STEVENSON, C. K.; LOURENCO, J. M.; CALLAWAY, T. R. Understanding rumen microbiology: an overview. *Encyclopedia*, v. 4, n. 1, p. 148-157, 2024.

PETRI, R. M.; SCHWAIGER, T.; PENNER, G. B.; BEAUCHEMIN, K. A.; FORSTER, R. J.; McKINNON, J. J.; McALLISTER, T. A. Changes in the rumen epimural bacterial diversity of beef cattle as affected by diet and induced ruminal acidosis. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 79, n. 12, p. 3744-3755, 2013.

PEREZ, H. G.; STEVENSON, C. K.; LOURENCO, J. M.; CALLAWAY, T. R. Understanding rumen microbiology: an overview. *Encyclopedia*, v. 4, n. 1, p. 148-157, 2024.

PLAIZIER, J. C. Replacing chopped alfalfa hay with alfalfa silage in barley grain and alfalfa-based total mixed rations for lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 87, n. 8, p. 2495-2505, 2004.

PLAIZIER, J. C.; DANESH MESGARAN, M.; DERA KHSHANI, H.; GOLDER, H.; KHAFIPOUR, E.; KLEEN, J. L. et al. Review: Enhancing gastrointestinal health in dairy cows. *Animal*, v. 12, p. s399–s418, 2018.

PLAIZIER, J. C.; KRAUSE, D. O.; GOZHO, G. N.; McBRIDE, B. W. Subacute ruminal acidosis in dairy cows: the physiological causes, incidence and consequences. *The Veterinary Journal*, v. 176, n. 1, p. 21-31, 2008.

PLAIZIER, J. C.; LI, S.; DANSCHER, A. M.; DERA KHSHANI, H.; ANDERSEN, P. H.; KHAFIPOUR, E. Changes in microbiota in rumen digesta and feces due to a grain-based subacute ruminal acidosis (SARA) challenge. *Microbial Ecology*, v. 74, p. 485-495, 2017.

PLAIZIER, J. C.; MULLIGAN, F. J.; NEVILLE, E. W.; GUAN, L. L.; STEELE, M. A.; PENNER, G. B. Invited review: Effect of subacute ruminal acidosis on gut health of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 105, n. 9, p. 7141-7160, 2022.

RAMOS, T. R.; PRADO, R. M.; ORNAGHI, M. G.; STUANI, O. F.; PENHA, G. P.; PRADO, I. N. SARA (Subacute Ruminal Acidosis) sua caracterização e consequências em bovinos: Revisão. *Pubvet*, v. 16, n. 6, p. 1-11, 2022.

ROQUE, B. M.; VENEGAS, M.; KINLEY, R. D.; DE NYS, R.; DUARTE, T. L.; YANG, X.; KEBREAB, E. Red seaweed (*Asparagopsis taxiformis*) supplementation reduces enteric methane by over 80 percent in beef steers. *PLoS One*, v. 16, n. 3, e0247820, 2021.

ROSENBERGER, G.; DIRKSEN, G.; GRUNDER, H. D.; GRUNERT, E.; KRAUSE, D.; STOBER, M.; MACK, R. Clinical examination of cattle. xvi + 453 p., 1979.

ROSSI, C. A. S.; COMPIANI, R.; BALDI, G.; TAYLOR, S. J.; RIGHI, F.; SIMONI, M.; QUARANTELLI, A. Replacing sodium bicarbonate with half amount of calcareous marine algae in the diet of beef cattle. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 48, p. e20180129, 2019.

RIVERA-CHACON, R.; CASTILLO-LOPEZ, E.; RICCI, S.; PETRI, R. M.; REISINGER, N.; ZEBELI, Q. Supplementing a phytogenic feed additive modulates the risk of subacute rumen acidosis, rumen fermentation and systemic inflammation in cattle fed acidogenic diets. *Animals*, v. 12, n. 9, p. 1201, 2022.

SABES, A. F.; GIRARDI, A. M.; ZANGIROLAMI FILHO, D.; BUENO, G. M.; OLIVEIRA, J. A.; MARQUES, L. C. Acid-base balance in sheep with experimentally induced acute ruminal lactic acidosis. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 69, n. 3, p. 637-643, 2017.

SEJIAN, V.; LAL, R.; LAKRITZ, J.; EZEJI, T. Measurement and prediction of enteric methane emission. *International Journal of Biometeorology*, v. 55, p. 1-16, 2011.

SHARMA, H.; PAL, R. P.; MIR, S. H.; MANI, V.; OJHA, L. Effect of feeding buffer on feed intake, milk production and rumen fermentation pattern in lactating animals: A review. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, v. 6, n. 4, p. 916-922, 2018.

SHIBATA, M.; TERADA, F. Factors affecting methane production and mitigation in ruminants. *Animal Science Journal*, v. 81, n. 1, p. 2-10, 2010.

SIMANUNGKALIT, G.; BHUIYAN, M.; BELL, R.; SWEETING, A.; MORTON, C. L.; COWLEY, F.; HEGARTY, R. The effects of antibiotic-free supplementation on the ruminal pH variability and methane emissions of beef cattle under the challenge of subacute ruminal acidosis (SARA). *Research in Veterinary Science*, v. 160, p. 30-38, 2023.

SILBERBERG, M.; MIALON, M. M.; MEUNIER, B.; VEISSIER, I. Sensor-captured modifications in cow behaviour under subacute ruminal acidosis. *Animal - Open Space*, v. 3, p. 100063, 2024.

SOMMAI, S.; AMPAPON, T.; MAPATO, C.; TOTAKUL, P.; VIENNASAY, B.; MATRA, M.; WANAPAT, M. Replacing soybean meal with yeast-fermented cassava pulp

(YFCP) on feed intake, nutrient digestibilities, rumen microorganism, fermentation, and N-balance in Thai native beef cattle. *Tropical Animal Health and Production*, v. 52, p. 2035-2041, 2020.

SUN, Y. Y.; CHENG, M.; XU, M.; SONG, L. W.; GAO, M.; HU, H. L. The effects of subacute ruminal acidosis on rumen epithelium barrier function in dairy goats. *Small Ruminant Research*, v. 169, p. 1-7, 2018.

SNYDER, E.; MFAM, B. C. Diagnosis and Treatment. *Digestive Disorders of the Forestomach, An Issue of Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v. 33, n. 3, p. 451, 2017.

STUDDERT, V. P.; GAY, C. C.; HINCHCLIFF, K. W. *Saunders Comprehensive Veterinary Dictionary*. Elsevier Health Sciences, 2020.

TEDESCHI, L. O.; ABDALLA, A. L.; ALVAREZ, C.; ANUGA, S. W.; ARANGO, J.; BEAUCHEMIN, K. A.; ... KEBREAB, E. Quantification of methane emitted by ruminants: a review of methods. *Journal of Animal Science*, v. 100, n. 7, p. skac197, 2022.

VAN SOEST, P. J. *Nutritional Ecology of the Ruminant*. 2. ed. London, UK: Comstock Publishing Associates, 1994.

VOULGARAKIS, N.; GOUGOULIS, D.; PSALLA, D.; PAPAKONSTANTINO, G.; ANGELIDOUTSIFIDA, M.; PAPATSIROS, V.; ... e CHRISTODOULOPOULOS, G. Ruminal acidosis Part I: Clinical manifestations, epidemiology and impact of the disease. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 74(3), 5883–5891. doi: 10.12681/jhvms.31237, 2023.

VIEIRA-NETO, A.; ZIMPEL, R.; LOPES JR, F. R.; SCHEFFLER, T. L.; BLOCK, E.; THATCHER, W. W.; SANTOS, J. E. P. Duration and degree of diet-induced metabolic acidosis prepartum alter tissue responses to insulin in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 104, n. 2, p. 1660-1679, 2021.

WANAPAT, M.; PRACHUMCHAI, R.; DAGAEW, G.; MATRA, M.; PHUPABOON, S.; SOMMAI, S.; e SURIYAPHA, C.. Potential use of seaweed as a dietary supplement to

mitigate enteric methane emission in ruminants. *Science of The Total Environment, 173015, 2024.

WU, Z.; BERNARD, J. K.; TAYLOR, S. J. Effect of feeding calcareous marine algae to Holstein cows prepartum or postpartum on serum metabolites and performance. *Journal of Dairy Science*, v. 98, n. 7, p. 4629-4639, 2015.

WYSOCKA, D.; SNARSKA, A.; SOBIECH, P. Iron in cattle health. *Journal of Elementology*, v. 25, n. 3, p. 1175-1185, 2020.

XIA, G.; SUN, J.; FAN, Y.; ZHAO, F.; AHMED, G.; JIN, Y.; WANG, H. β -sitosterol attenuates high grain diet-induced inflammatory stress and modifies rumen fermentation and microbiota in sheep. *Animals*, v. 10, n. 1, p. 171, 2020.

XU, T. L.; SEYFERT, H. M.; SHEN, X. Z. Epigenetic mechanisms contribute to decrease stearyl-CoA desaturase 1 expression in the liver of dairy cows after prolonged feeding of high-concentrate diet. *Journal of Dairy Science*, v. 101, n. 3, p. 2506-2518, 2018.

ZEBELI, Q.; DIJKSTRA, J.; TAJAJ, M.; STEINGASS, H.; AMETAJ, B. N.; DROCHNER, W. Modeling the adequacy of dietary fiber in dairy cows based on the responses of ruminal pH and milk fat production to composition of the diet. *Journal of Dairy Science*, v. 91, n. 5, p. 2046-2066, 2008.

ZEBELI, Q.; MANSMANN, D.; STEINGASS, H.; AMETAJ, B. N. Balancing diets for physically effective fibre and ruminally degradable starch: A key to lower the risk of sub-acute rumen acidosis and improve productivity of dairy cattle. *Livestock Science*, v. 127, n. 1, p. 1-10, 2010.

ZEBELI, Q.; ASCHENBACH, J. R.; TAJAJ, M.; BOGUHN, J.; AMETAJ, B. N.; DROCHNER, W. Invited review: Role of physically effective fiber and estimation of dietary fiber adequacy in high-producing dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, v. 95, n. 3, p. 1041-1056, 2012.

ZHANG, R.; YE, H.; LIU, J.; MAO, S. High-grain diets altered rumen fermentation and epithelial bacterial community and resulted in rumen epithelial injuries of goats. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 101, n. 18, p. 6981-6992, 2017.

ZHANG, H.; PENG, A. L.; ZHAO, F. F.; YU, L. H.; WANG, M. Z.; OSORIO, J. S.; WANG, H. R. Thiamine ameliorates inflammation of the ruminal epithelium of Saanen goats suffering from subacute ruminal acidosis. *Journal of Dairy Science*, v. 103, n. 2, p. 1931-1943, 2020.

ZHAO, C.; BOBE, G.; WANG, Y.; ZHANG, X.; ZHAO, Z.; ZHANG, S.; LIU, G. Potential role of *SLC5A8* expression in the etiology of subacute ruminal acidosis. *Frontiers in Veterinary Science*, v. 7, p. 394, 2020.

ZHAO, C.; LIU, G.; LI, X.; GUAN, Y.; WANG, Y.; YUAN, X.; LI, X. Inflammatory mechanism of rumenitis in dairy cows with subacute ruminal acidosis. *BMC Veterinary Research*, v. 14, p. 1-8, 2018

Anexos

Anexo A – Parecer de aprovação do CEEA



PARECER Nº 52/2021/CEEA/REITORIA
PROCESSO Nº 23110.013784/2021-27

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada **“Influência da suplementação com diferentes tamponantes no ambiente ruminal, perfil comportamental, desempenho zootécnico e produtividade de ruminantes”**, registrada com o nº 23110.013784/2021-27, sob a responsabilidade de **Márcio Nunes Corrêa** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua execução pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de **11 de junho de 2021**.

Finalidade	(x) Pesquisa () Ensino
Vigência da autorização	18/06/2021 a 30/12/2023
Espécie/linhagem/raça	Bovina/Holandês
Nº de animais	54
Idade	Adultos lactantes
Sexo	Fêmeas
Origem	Fazenda comercial localizada no município de Rio Grande, Rio Grande do Sul.

Código para cadastro nº **CEEA 13784-2021**

M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da CEEA



Documento assinado eletronicamente por **ANELIZE DE OLIVEIRA CAMPELLO FELIX, Médico Veterinário**, em 18/06/2021, às 11:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1335718** e o código CRC **A0D1CDB5**.

Referência: Processo nº 23110.013784/2021-27

SEI nº 1335718